Synthese und Konformation membranmodifizierender Analoga des Nonadekapeptid-Antibiotikums Alamethicin

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Raymond Oekonomopulos

aus Schorndorf

1978

78 524

Synthese und Konformation membranmodifizierender Analoga des Nonadekapeptid-Antibiotikums Alamethicin

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Raymond Oekonomopulos
aus Smyrna/Izmir

1978

Synthese und Konformation membranmodifizierender Analoga des Nonadekapeptid-Antibiotikums Alamethicin

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Raymond Oekonomopulos

aus Schorndorf

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung	: 6.12.1978
Dekan	: Prof. Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter	: Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter	: Priv.-Doz. Dr. M. Mutter

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Günther Jung

in der Zeit von März 1976 bis September 1978 im Chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Jung
danke ich herzlich für die Themenstellung, für sein stetes Interesse an der Arbeit und für viele wertvolle Anregungen.

Mein Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. E. Bayer für die bereitwillige Überlassung von Institutseinrichtungen.

Dem Verband der Chemischen Industrie e.V. danke ich vielmals für die Gewährung eines Stipendiums.

MEINER FAMILIE

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Primär- und Sekundärstruktur membranmodifizierender Peptidantibiotika	1
1.2.	Membranmodifizierende Eigenschaften	3
1.3.	Gründe für die Synthese von Alamethicin-analoga	4
1.4.	Problemstellung	7
2.	Peptidsynthesen	8
2.1.	Strategie	8
2.2.	Konventionelle Synthese des Nonadekapeptids (Ia,b) und des Hexadekapeptids (II)	10
2.2.1.	Syntheseplan	10
2.2.2.	Auswahl der Kupplungsmethoden	11
2.2.3.	Darstellung der Fagmente A bis D	12
2.2.3.1.	Synthese von BOC-Aib-L-Ala-Aib-Ala-Aib-OH (Fragment A)	12
2.2.3.2.	Synthese von H-L-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe (Fragment B)	18
2.2.3.3.	Synthese von BOC-Gly-L-Ala-Aib-OH (Fragment C)	19
2.2.3.4.	Synthese von H-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu (OBzl)-Gln-OMe (Fragment D)	20
2.2.4.	Fragmentkondensation zum Hexadekapeptid BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu (OBzl)-Gln-OMe	23
2.2.5.	Fragmentkondensation zum Nonadekapeptid BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe	26
2.3.	Schrittweise Synthese des Tetradekapeptids H-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_7$-OPOE am polymeren Träger	28
2.3.1.	Hydrazinolyse der Peptid-Polymer-Ester	32

3.	Konformationsstudien	33
3.1.	Circulardichroismus	33
3.1.1.	CD-Spektren	35
3.1.2.	Konformationsanalyse	48
3.2.	FT-FIR-Spektroskopie	56
3.3.	^{13}C-NMR-Spektroskopie	59
3.3.1.	^{13}C $\{^{13}C-^{1}H\}$ Tripel-Resonanz-Spektren von polymergebundenen Peptiden	60
3.3.2.	^{13}C-NMR-Spektren von BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe und einer Auswahl der zur Synthese benutzten Peptidfragmente	67
4.	Membranmodifizierende Wirkung	84
4.1.	Dosis-Wirkungskurven der Hämolyse	84
4.2.	Untersuchungen an künstlichen Lipid-Doppelschichten	86
5.	Ergebnisse und Diskussion	90
6.	Experimenteller Teil	97
6.1.	Chemikalien und analytische Methoden	97
6.2.	Darstellung der Aminosäurederivate	99
6.3.	Darstellung der Peptidderivate	104
6.3.1.	Dipeptide	104
6.3.2.	Tripeptide	107
6.3.3.	Längere Peptide	114
6.4.	Hydrazinolyse der Peptid-Polymer-Ester BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE	126
6.5.	Spektroskopie	126
6.5.2.	FT-FIR-Spektroskopie	127
6.5.3.	PFT-^{13}C-NMR-Spektroskopie	127
6.6.	Hämolyse	128
6.6.1.	Einstellung der Erythrozytensuspension	128
6.6.2.	Aufnahme der Dosis-Wirkungskurven der Hämolyse	128
6.7.	Leitfähigkeitsmessungen an künstlichen Lipid-Doppelschichtmembranen	129
7.	Zusammenfassung	130
8.	Literaturverzeichnis	132

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

Ac	Acetyl
Aib	α-Aminoisobuttersäure bzw. 2-Methyl-alanin
BOC	tert-Butyloxycarbonyl
CD	Circulardichroismus
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	Dicyclohexylharnstoff
DCHA	Dicyclohexylammonium
FIR	Fernes Infrarot
Fp	Schmelzpunkt
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
MeOH	Methanol
OBzl	Benzylester
OMe	Methylester
PFT	Puls Fourier Transform
Phol	Phenylalaninol bzw. 2-Amino-3-phenyl-1-propanol
POE	Polyoxyethylen bzw. Polyethylenglykol
TDM	4,4'-Tetramethyl-diamino-diphenylmethan
TMS	Tetramethylsilan

Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen den IUPAC-Regeln

1. Einleitung

Bei der Aufteilung der Zelle in Kompartimente stellen Membranen eine Grundvoraussetzung für den störungsfreien Ablauf biochemischer Prozesse dar. Als lipophile Barriere für die meist hydrophilen Reaktionsprodukte verfügt die biologische Membran dennoch über die Möglichkeit, Ionen und Moleküle mittels Transportproteinen von einem Zellraum in den anderen zu schleusen. Der molekulare Mechanismus dieser Transportphänomene ist eines der Schlüsselprobleme zum Verständnis der Reaktionsabläufe in der Zelle.
Transport-Untersuchungen werden an den komplex gebauten Membranproteinen selbst durchgeführt, jedoch konnten molekulare Details bislang nur mit Hilfe von Modellsystemen, sogenannter Ionophore, erklärt werden. Ionophore sind amphiphile Substanzen mit der Molmasse 700-2000 g/mol, die in der Lage sind, Ionen durch Membranen zu transportieren. Am besten untersucht ist das cyclische Depsipeptid Valinomycin (1), das als Carrier spezifisch Kalium-Kationen unter Bildung lipidlöslicher Komplexe durch die Membran transportiert. Ein anderer Typ von Peptidantibiotika bewirkt den Ionentransport nicht nach einem Carrier-Mechanismus, sondern unter Bildung hydrophiler Aggregate, die als "Poren" bezeichnet werden.

1.1. Primär- und Sekundärstruktur membranmodifizierender Peptidantibiotika

Die bisher aus verschiedenen Stämmen des Fadenpilzes Trichoderma hamatum bzw. Trichoderma viride isolierten Peptidantibiotika Alamethicin (2), Suzukacillin (3,4) und Trichotoxin (5,6) zeigen sowohl in der Sequenz als auch in der Konformation und somit in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften große Ähnlichkeit. Die hohe Lipophilie der Analoga wird durch die große Zahl

aliphatischer Aminosäuren bewirkt. Besonders auffallend ist der große Gehalt an α-verzweigter α-Aminoisobuttersäure (Aib), die sonst nur sehr selten natürlich vorkommt.

Die Primärstruktur von Alamethicin, der bestuntersuchten Spezies dieser Peptidantibiotika, wurde in der grundlegenden Arbeit von Payne, Jakes und Hartley (7) aufgeklärt und später massenspektroskopisch von Ovchinnikov et al. (8) bestätigt. Durch den Nachweis des Aminoalkohols ß-L-Phenylalaninol (9,10,11,12) und des N-Terminus Ac-Aib (11) wurde die ursprünglich aufgrund indirekter Beweisführung geforderte cyclische Struktur (7,8) für Alamethicin revidiert und als offenkettig erkannt (11). Die Untersuchungen führten zu folgender Primärstruktur von Alamethicin F-30.

Ac-Aib-L-Pro-Aib-Ala-Aib-Ala-Gln-Aib-Val-Aib-Gly-Leu-Aib-Pro-Val-Aib-Aib-Glu(OH)-Gln-Phol.

Das von Irmscher und Jung (13) als Hauptkomponente isolierte Alamethicin-Analogon F-50 weist vermutlich dieselbe Sequenz auf, nur ist in Position 18 Glutaminsäure durch Glutamin ersetzt.

Eine eindeutige Konformationsermittlung durch Röntgenbeugung war bisher nicht möglich, da von Alamethicin aufgrund seiner Mikroheterogenität keine brauchbaren Kristalle erhalten werden konnten. Eine Röntgenstrukturanalyse des N-terminalen Tetrapeptids von Alamethicin, Ac-Aib-L-Pro-Aib-Ala-OMe (14), führt bereits bei diesem kurzen Peptid zu der geordneten Konformation eines ß-Turns, der in seiner räumlichen Anordnung einer Windung der 3_{10}-Helix entspricht. Ausführliche Konformationsuntersuchungen von Alamethicin in Lösung mittels Circulardichroismus (CD) (10,15,16) und ^{13}C-NMR-Spektroskopie (10) weisen auf einen signifikanten α-Helixgehalt hin, der von polaren zu lipophilen Lösungsmitteln von etwa 20 % auf 40 % zunimmt. Nach theoretischen Konformationsberechnungen der früheren, cyclischen Alamethicinsequenz (17) ist der N-terminale Peptidbereich für die Helixbildung verantwortlich. Dies

konnte durch Synthesen des N-terminalen Undekapeptid-fragments (18) bestätigt werden; das Peptid zeigt ein für die α-Helix charakteristisches CD-Spektrum, die Elliptizitäten von Alamethicin werden jedoch noch nicht erreicht.

1.2. Membranmodifizierende Eigenschaften

Neben ihrer antibiotischen Wirksamkeit (19) zeichnen sich Alamethicin und Analoga durch ihre lytische Aktivität gegenüber Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, Human-Erythrozyten, Mäuse-Lymphozyten sowie Ratten-Mastzellen aus (9,13,19-22). Größeres Interesse erwecken diese Peptide jedoch erst seit der Beobachtung, daß sie den Ionentransport durch Mitochondrien-Membranen als ionophore Peptidantibiotika stimulieren (23). Bei Untersuchungen an künstlichen Lipid-Bilayer-Membranen (22,24-30) induzieren Alamethicin, Suzukacillin und Trichotoxin eine spannungsabhängige, fluktuierende Ionenleitfähigkeit. Die Peptidantibiotika können daher als Modellsubstanzen zur Erzeugung elektrischer Erregungsphänomene und Aktionspotentiale in Nervenzellen dienen.
Im Gegensatz zu anderen membranmodifizierenden Peptiden mit mobilem Carrier-Mechanismus differenzieren Alamethicin und Analoga beim Ionentransport nicht zwischen monovalenten Kationen (24). Nach neuesten Untersuchungen an Alamethicin (31) verläuft die Bildung einer ionentransportierenden Pore in der Membran über die Vorstufe eines hexameren Aggregates, dessen Stabilisierung über hydrophobe Wechselwirkung erfolgt. Als Folge des großen Dipolmoments der α-Helix (32) vollzieht sich unter dem Einfluß des elektrischen Feldes eine Einschiebung in die Membran. Durch die lipophile Umgebung in der Membran wird kooperativ eine Konformationsänderung mit Vergrößerung des Helixanteils ausgelöst, wie dies bereits bei CD-Messungen an Lecithin-Vesikeln gezeigt werden konnte (10). Durch Aufnahme einzelner Alamethicin-Moleküle wächst die Pore schließlich heran und erreicht

ihre verschiedenen Leitfähigkeitszustände.
Das komplexe Aggregations- und Konformationsverhalten von Alamethicin und Analoga erfordert weitere Untersuchungen, die allerdings mit Hilfe verschiedener Modellpeptide vorteilhafter durchgeführt werden können.

1.3. Gründe für die Synthese von Alamethicinanaloga

Die nicht ribosomale Biosynthese der untersuchten Peptidantibiotika an Multi-Enzym-Komplexen mit relativ geringer Spezifität (34-36), führt zu einer auffälligen Mikroheterogenität. So findet man bei Alamethicin und Trichotoxin einen teilweisen Ersatz der freien Carboxylgruppe der Glutaminsäure durch eine Säureamidgruppe (19, 37). Während eine Trennung von Analoga mit Amid- und Säurefunktion noch durchführbar ist, wird sie bei einem Austausch von L-Ala und Aib, wie er z.B. bei Alamethicinanalogen vorkommt (7,8), praktisch unmöglich, besonders da meist mehrere Austauschstellen im Molekül beobachtet werden. Mittels analytischer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) lassen sich sechs Alamethicinkomponenten nachweisen (19) und bei Trichotoxin A-50 findet man nach ausführlichen Craig-Verteilungen einzelne Fraktionen mit kontinuierlicher Zu- bzw. Abnahme in ihren Aminosäureverhältnissen (38). Aus diesem Grund wäre ein Peptidantibiotikum mit einheitlicher Sequenz sowohl bei der Derivatisierung dieser Peptide zur Erforschung der Transportmechanismen, als auch bei der Interpretation der verschiedenen spektroskopischen Daten von großem Nutzen.
Infolge der geringen Reaktivität von Peptiden mit der sterisch gehinderten α-Aminoisobuttersäure (39,40) blieben zwei Syntheseversuche von Alamethicin (41,42) erfolglos. Erst 1977 gelang eine Darstellung durch Kombination von Merrifieldsynthese und Fragmentkondensation (43). Das synthetische Alamethicin war dem natürlichen zwar in den membranmodifizierenden Eigenschaften sehr ähnlich, dennoch waren beide Peptide nicht identisch. Wir beschlossen

bei der Synthese die Toleranz der natürlichen Peptidantibiotika gegenüber Aminosäureaustausch auszunutzen und suchten stärker abgeänderte Peptidmodelle zu Alamethicin, die folgende Kriterien erfüllen sollten:

a) Wie bei Alamethicin werden nur aliphatische Aminosäuren verwendet und der hohe Gehalt an α-verzweigter, optisch inaktiver α-Aminoisobuttersäure wird berücksichtigt.
b) Die über weite Bereiche alternierende Sequenz Aib-Aminosäure-Aib-Aminosäure wird beibehalten.
c) Der amphiphile Charakter mit dem lipophilen Bereich am N-terminalen Ende soll erhalten bleiben.
d) Die synthetischen Peptide sollen zumindest angenähert die Konformation des natürlichen aufweisen.
e) Eine membranmodifizierende Wirkung soll erzielt werden.

Die Entscheidung über die Abänderung des N-Terminus wird weitgehend von unseren Erfahrungen bei der Synthese des N-terminalen Alamethicin-Undekapeptids und von Modellpeptiden hierzu beeinflußt (18). Die optisch aktiven L-Aminosäuren Leucin und Valin in Alamethicin werden durch Alanin ersetzt, ein Austausch, der die Konformation nur wenig beeinflußt (44). Dies ergibt bei Vernachlässigung des Ac-Aib-Pro-N-Terminus und der Gln-7-Komponente ein N-terminales Dekapeptid, das ausschließlich aus den Aminosäuren L-Alanin und α-Aminoisobuttersäure in alternierender Sequenz besteht. Im C-terminalem Nonapeptid werden die backbone-beeinflussenden Aminosäuren L-Prolin und Glycin beibehalten, ebenso die beiden polaren L-Aminosäuren Glutaminsäure und Glutamin am C-Terminus. Statt des Säure-Amids (Alamethicin F-50) bzw. der freien Carboxylgruppe (Alamethicin F-30) an Glu-18 wird die Benzylestergruppierung und für das L-Phenylalaninol an Gln-19 der Methylester gewählt. Die Estergruppierungen können für eine weitere Derivatisierung selektiv entfernt werden. Auf diese Weise ergibt sich ein voll geschütztes Nonadekapeptid (Abb. 1.1, Peptid Ia), das durch Hydrierung

leicht in die freie Säure (Abb. 1.1, Peptid Ib) überführt werden kann. In weiterer Vereinfachung soll das ebenfalls noch amphiphile Hexadekapeptid (Abb. 1.1, Peptid II) dargestellt werden. Mit diesem Hexadekapeptid kann untersucht werden, welche N-terminale Helixlänge zur Membranmodifizierung erforderlich ist, und ob der von Jung et al. (10,13,56) als essentiell angesehene Glycinrest für eine Zunahme des Helixanteils beim Eintritt in die Membran notwendig ist.

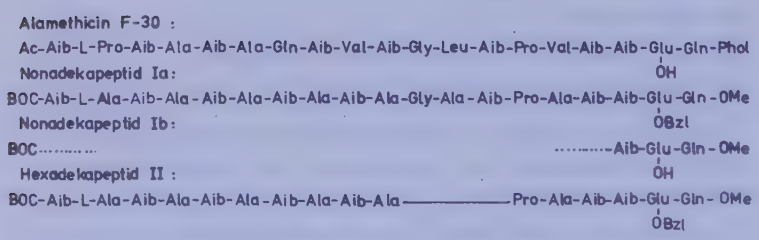


Abb. 1.1 Vergleich der synthetischen Modellpeptide mit Alamethicin F-30

Da Konformationsanalysen, insbesondere mittels CD-Spektroskopie, durch Vergleiche mit genau analysierten Proteinen oder Polypeptiden vorgenommen werden, erscheint es uns aufgrund der relativ geringen Länge der Modellpeptide und des hohen Gehaltes an achiraler α-Aminoisobuttersäure erfolgversprechender, speziell auf unsere Peptide ausgerichtete Oligomere als Vergleich heranzuziehen. Es bieten sich Oligomere der Form BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-POE (n = 1-7) bzw. BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_m$-OPOE (m = 1-6) an, die durch stufenweise Synthese am löslichen polymeren Träger dargestellt werden sollen (45,46).

1.4. Problemstellung

a) Das Nonadekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Ia), dessen Derivat mit freier γ-Carboxylgruppe an der Glutaminsäure (Ib), und das Hexadekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (II) sollen durch konventionelle Fragmentkondensation dargestellt werden.

b) Die CD- und ^{13}C-NMR-Spektren der synthetischen Peptide sollen zum Zwecke einer Konformationsuntersuchung aufgenommen werden.

c) Die Peptide sollen auf ihre membranmodifizierende Wirkung überprüft werden.

d) Oligomere mit alternierender Aib-L-Ala-Sequenz sollen als Modelle durch stufenweise Synthese am löslichen polymeren Träger (45,46) bis zum Tetradekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_7$-OPOE dargestellt werden. Bis zum Dekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OPOE wurden diese Oligomere bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (47) synthetisiert und standen zur Verfügung.

e) Neben dem Circulardichroismus sollen auch neue konformationsanalytische Methoden wie die ^{13}C $\{^{13}C-^{1}H\}$ Tripelresonanz-PFT-NMR- und FT-FIR-Spektroskopie der Oligomere am polymeren Träger für Konformationsvergleiche herangezogen werden.

2. Peptidsynthesen

2.1. Strategie

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese der modifizierten Peptidantibiotika durch konventionelle Fragmentkondensation durchgeführt, die Modellpeptide zunehmender Kettenlänge werden dagegen durch Synthese am solubilisierenden polymeren Träger (45,46) erstellt; daher sollen die beiden Strategien im Hinblick auf die Synthese zusammenfassend diskutiert werden.
Bei der klassischen Peptidsynthese werden zunächst einzelne Partialsequenzen, sog. Fragmente synthetisiert, die anschließend zu immer größeren Einheiten verknüpft werden. Die Reaktionen führt man in homogener Lösung durch; jedes Zwischenprodukt wird mit oft sehr hohem Zeitaufwand isoliert, gereinigt und analysiert. Aufgrund der klaren Konzeption und der eindeutigen Charakterisierbarkeit jedes Syntheseproduktes bietet diese Strategie gegenüber der Synthese am polymeren Träger Vorteile bei der Darstellung der Peptide Ia,b und II als synthetische Analoga der membranmodifizierenden Peptidantibiotika. Zudem ist bei der angestrebten Peptidlänge und den lipophilen Aminosäurebausteinen eine zu starke Abnahme der Löslichkeit nicht zu befürchten. Schließlich müssen auch partielle Änderungen in der angestrebten Sequenz zur Modifizierung der biologischen Wirksamkeit eingeplant werden; hierbei erweist sich die konventionelle Synthese als die flexibelste.
Dagegen bietet sich die stufenweise Synthese am polymeren Träger zum Aufbau einer kontinuierlich wachsenden Peptidkette an. Diese Strategie wurde von Merrifield (48,49) mit der Solid-Phase-Peptidsynthese am unlöslichen Polystyrol-Träger eingeführt. Die universelle Anwendbarkeit der Methode wird jedoch sehr stark eingeschränkt, da bei der schwierigen Erreichbarkeit annähernd quantitativer Kupplungen, in Verbindung mit dem Verzicht auf Isolierung und Reinigung der Zwischenprodukte, ein hoher Anteil an

Fehlsequenzen entsteht (50); diese können wegen ihrer Ähnlichkeit vom gewünschten Produkt nicht mehr abgetrennt werden. Daher eignet sich die heterogene Solid-Phase-Synthese höchstens zur Darstellung kurzer Peptidketten, wobei der Zeitgewinn während der Synthese meist bei der Aufreinigung der Peptidgemische wieder verloren geht. Eine Methode, die manche Prinzipien der Solid-Phase-Methode und der konventionellen Peptidsynthese in sich vereinigt, ist die 1971 von Mutter und Bayer (45,46) beschriebene Liquid-Phase-Methode. Als Träger dient bifunktionelles Polyoxyethylen mit mittleren Molmassen von 2000 bis 20 000 g/mol, welches eine solubilisierende Wirkung auf die zu synthetisierende Peptidkette besitzt. Das Polymer wird mit der Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure verestert und dient somit als C-terminale Schutzgruppe. Da Polyoxyethylen sowohl in Wasser als auch in den meisten organischen Lösungsmitteln außer Ether und Petroläther gut löslich ist, kann analog der konventionellen Strategie in homogener Phase gekuppelt werden. Außerdem läßt sich das Peptidpolymer auf einfache Weise kristallin ausfällen (51), so daß überschüssige, niedermolekulare Verbindungen meist leicht ausgewaschen werden können. Der Peptidaufbau, bei dem alle gängigen Kupplungsmethoden und Schutzgruppen eingesetzt werden können, erfolgt schrittweise und ohne Zwischenreinigung der einzelnen Fragmente. Ein Nachteil, der jeder schrittweisen Trägersynthese anhaftet, gilt allerdings auch für die Liquid-Phase-Methode: ein vollständiger Kupplungsumsatz ist auch mit Nachkupplungen oft nur sehr schwer zu erreichen. Allerdings stellen gegenüber der Solid-Phase-Synthese einfacher und reproduzierbarer durchzuführende Umsatzkontrollen (52) einen wichtigen Fortschritt dar. Zusätzlich ergibt sich durch die Löslichkeit des Peptidpolymers die Möglichkeit der direkten Identifizierung der Zwischenprodukte durch Aminosäureanalyse, sowie durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie (53,54) und chiroptische Methoden (55-57). Die Liquid-Phase-Methode eignet sich somit sehr

gut zur schnellen Darstellung von Polyaminosäuren und sequenzpolymeren Peptiden (45,46,55), die als Modelle für physikalische und biologische Untersuchungen aufgebaut werden sollen.

2.2. Konventionelle Synthese des Nonadekapeptids (Ia,b) und des Hexadekapeptids (II)

2.2.1. Syntheseplan

Betrachtet man die Sequenz des Nonadekapeptids (Ia), so sieht man, daß sich bei richtiger Fragmentierung an sechs Stellen das Dipeptidfragment -L-Ala-Aib- einbauen läßt.

BOC-Aib^{1}-L-Ala^{2}-Aib^{3}-Ala^{4}-Aib^{5}-Ala^{6}-Aib^{7}-Ala^{8}-Aib^{9}-Ala^{10}-Gly^{11}-Ala^{12}-Aib^{13}-Pro^{14}-Ala^{15}-Aib^{16}-Aib^{17}-Glu^{18}(OBzl)-Gln^{19}-OMe

Dieses Dipeptidfragment stellt somit den Grundbaustein für die weiteren Fragmente dar.
Die Syntheseführung sollte ferner die Darstellung einiger Fragmente mit alternierender Aib-L-Ala-Sequenz ermöglichen, die bereits im Rahmen der Diplomarbeit (47) am löslichen polymeren Träger Polyoxyethylen schrittweise synthetisiert wurden. Bei Auswahl von BOC-L-Ala^{8}-Aib-Ala^{10}-OMe, BOC-Aib^{1}-(L-Ala-Aib^{5})$_2$-OMe, BOC-L-Ala^{6}-(Aib-Ala^{10})$_2$-OMe und BOC-(Aib^{1}-L-Ala^{10})$_5$-OMe kann die Fragmentauswahl zudem so gestaltet werden, daß zwischen Position 5 und 6 eventuell noch - analog der Alamethicin-Sequenz - ein Gln-Einbau möglich ist. Auf diese Weise erhält man folgende N-terminalen Fragmente.
Fragment A: Pentapeptid BOC-Aib^{1}-(L-Ala-Aib^{5})$_2$-OH
Fragment B: Pentapeptid H-L-Ala^{6}-(Aib-Ala^{10})$_2$-OMe
Als Fragment C bietet sich das Tripeptid BOC-Gly-L-Ala-Aib-OH an, da es zur Synthese des amphiphilen Hexadekapeptids BOC-(Aib^{1}-L-Ala^{10})$_5$-Pro^{14}-Ala^{15}-Aib^{16}-Aib^{17}-Glu^{18}(OBzl)-Gln^{19}-OMe (II) nicht benötigt wird.

Bei dieser Syntheseführung bleibt als Fragment D das Hexapeptid H-L-Pro^{14}-Ala^{15}-Aib^{16}-Aib^{17}-Glu^{18}(OBzl)-Gln^{19}-OMe, zu dessen Darstellung eine Verknüpfung der beiden Tripeptide zwischen Aib-16 und Aib-17 in Kauf genommen werden muß. Hier mußte eine sterische Hinderung durch die α-substituierten Aminosäuren an der Kupplungsstelle erwartet werden (39,40). Im nächsten Schritt sollte aus dem Fragment A und B das Dekapeptid 1 - 10 und aus C und D das Nonapeptid 11 - 19 synthetisiert werden. Als letzte Fragmentkondensation zum Nonadekapeptid Ia wird entgegen dem üblichen Vorgehen das größere Dekapeptidfragment 1 - 10 als Carboxylkomponente gewählt, da einerseits eine Kupplung zwischen Ala-10 und Gly-11 sterisch wenig behindert ist und zudem dasselbe Carboxylfragment auch zur Synthese des Hexadekapeptids (II) eingesetzt werden kann.

2.2.2. Auswahl der Kupplungsmethoden

Für die Synthese der kleineren Di- und Tripeptidfragmente mit einer geschützten Aminosäure als Carboxylkomponente wurde hier meist die gemischte Anhydridmethode (58-62) der 1-Hydroxybenzotriazol/Dicyclohexylcarbodiimid (HOBt/DCC)-Kupplung (63-65) vorgezogen, da sie in allen Fällen zu einer wesentlich einfacheren Aufarbeitung der Reaktionsprodukte führte und auch meist höhere Ausbeuten lieferte, wie Tabelle 2.1 zeigt.

Tab. 2.1 Vergleich der Ausbeuten von Kupplungen nach der gemischten Anhydrid- bzw. HOBt/DCC-Methode

Kupplungskomponenten	gem. Anhydrid Ausbeute (%)	HOBt/DCC Ausbeute (%)
BOC-L-Ala-OH + H-Aib-OMe	97	52
BOC-Aib-OH + H-L-Ala-Aib-OMe	80	25
BOC-Gly-OH + H-L-Ala-Aib-OMe	30	50
BOC-L-Pro-OH + H-L-Ala-Aib-OMe	68	70
BOC-L-Glu(OBzl)-OH + H-L-Gln-OMe	91	} nicht
BOC-Aib-OH + H-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe	93	} durchgeführt

Dagegen führten Kupplungen mit Beteiligung größerer Carboxylkomponenten besonders mit Aib als C-Terminus bei der gemischten Anhydrid-Methode zu sehr unbefriedigenden Ergebnissen, wie am Beispiel der Kupplung von BOC-L-Ala-Aib-OH mit H-L-Ala-Aib-Ala-OMe gezeigt wurde; diese führte bei der gemischten Anhydrid-Kupplung zu 10 % Ausbeute, während mit 1-Hydroxybenzotriazol/Dicyclohexylcarbodiimid 65 % Ausbeute erzielt wurden. Die größeren Fragmente wurden daher nach der HOBT/DCC-Methode verknüpft, die mit Ausnahme der Aib^{16}-Aib^{17}-Kupplung zum Fragment D (15 % Ausbeute) zu befriedigenden Ergebnissen führte. Eine versuchte Azidkupplung (66-68) zu Fragment D scheiterte schon an der unvollständigen Überführung des BOC-L-Pro-Ala-Aib-OMe in das entsprechende Hydrazid. Bereits Kendrick (42) berichtet von einem Versagen der Azidmethode bei Fragmenten mit C-terminalem Aib. Entsprechend diesen Ausführungen konnten die Synthesen des Hexadekapeptids (II) und Nonadekapeptids (Ia) schließlich, wie in Abb. 2.1 dargestellt, durchgeführt werden.

2.2.3. Darstellung der Fragmente A bis D

2.2.3.1. Synthese von BOC-Aib-L-Ala-Aib-Ala-Aib-OH (Fragment A)

Zunächst wurden BOC-L-Ala-OH und H-Aib-OMe x HCl nach der gemischten Anhydrid-Methode mit Chlorameisensäureisobutylester und N-Methylmorpholin zum Dipeptidgrundbaustein BOC-L-Ala-Aib-OMe gekuppelt, der insgesamt an sechs Stellen des Peptids eingebaut werden kann.
Da das ölige Produkt allen Kristallisationsversuchen widerstand (siehe auch 42), wurde es außer auf Reinheitskriterien mittels Dünnschichtchromatographie und Aminosäureanalyse nicht weiter analysiert. Erst die durch Schutzgruppenabspaltung erhaltenen Folgeprodukte fielen kristallin an. Zur Darstellung des Tripeptids BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe wurde die tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe des Dipeptids BOC-L-Ala-Aib-OMe mittels Trifluoressigsäure/Dichlormethan abgespalten.

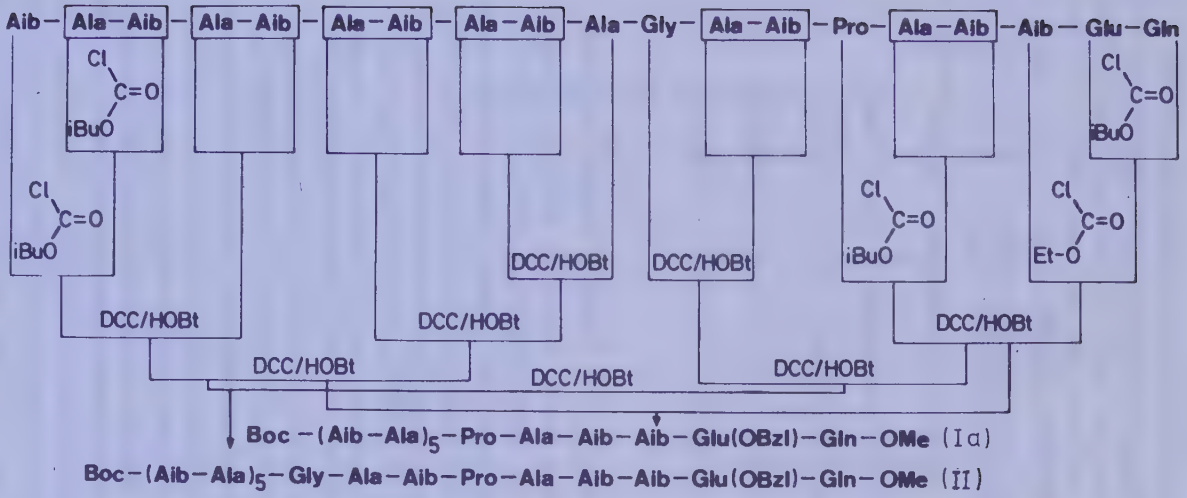


Abb. 2.1 Syntheseplan des Nonadekapeptids (Ia) und des Hexadekapeptids (II)

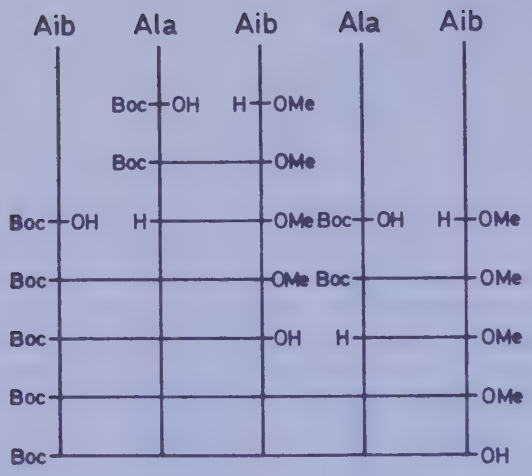


Abb. 2.2. Syntheseschema von BOC-Aib-L-Ala-Aib-Ala-Aib-OH

Auf eine Demaskierung mit HCl/Eisessig wurde in diesem Falle verzichtet, da das Hydrochlorid nicht kristallisiert werden konnte (42). Die Gefahr einer Trifluoracetylierung ist bei Kupplungen mit HOBt/DCC sehr gering (69, 70). Auch bei Verknüpfungen über das Anhydrid konnte bei den durchgeführten Synthesen mit Trifluoracetaten der Peptide keine Trifluoracetylierung festgestellt werden. Das kristalline H-L-Ala-Aib-OMe x CF_3COOH wurde nach Neutralisation mit N-Methylmorpholin mit dem gemischten Anhydrid aus BOC-L-Aib-OH, Chlorameisensäureisobutylester und N-Methylmorpholin umgesetzt und reagierte innerhalb von 4 Stunden in 80 %iger Ausbeute zu BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe, das nach Extraktion und Kristallisation aus Essigester/Petroläther dünnschichtchromatographisch rein war und gute Elementar- und Aminosäureanalysen lieferte. Das ^{13}C-NMR-Spektrum des Tripeptids in Abb. 3.18 ist ein weiterer Identitätsbeweis.

Die anschließende Esterverseifung von BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe in Methanol/1n NaOH verläuft wie alle übrigen durchgeführten Methylesterverseifungen von Peptiden mit C-terminalem Aib sehr langsam. Die beiden Methylgruppen in α-Stellung erschweren den nucleophilen Angriff der Hydroxylionen auf die Carboxylgruppe. Zur Verdeutlichung wurde eine Verseifungskinetik der beiden vergleichbaren Tripeptide BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe und BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe aufgenommen (Abb. 2.3).

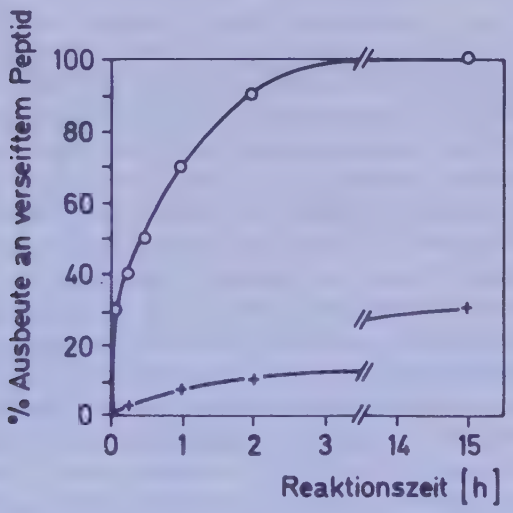


Abb. 2.3 Verseifungskinetik der Tripeptide BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe (+) und BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe (o) in MeOH/1n NaOH (7:3) bei 23°C

Ein Vergleich der Verseifungsgeschwindigkeiten zeigt, daß BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe nach 2 Stunden erst zu 10 %, nach 15 Stunden zu 30 % verseift wurde, während BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe nach 2 Stunden zu 90 % und nach 15 Stunden vollständig umgesetzt war. Um eine höhere Verseifungsgeschwindigkeit zu erzielen wurde die Reaktionstemperatur auf 40°C erhöht, da Racemisierung am achiralen C-Terminus von BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe nicht auftreten kann. Nach 2 Stunden

konnte eine etwa 90 %ige Verseifung zu BOC-Aib-L-Ala-Aib-OH erreicht werden; bei Reaktion über Nacht war der eingesetzte Tripeptidester zwar völlig verschwunden, aber ein zusätzliches Nebenprodukt war neu entstanden. So wurde die Verseifung nach 2 Stunden bei 40°C abgebrochen und der nicht umgesetzte Ester von der Peptidsäure durch Verteilen zwischen $NaHCO_3$- und Essigesterphase abgetrennt. Nach Essigester/Petroläther-fällung konnte BOC-Aib-L-Ala-Aib-OH in 63 %iger Ausbeute rein erhalten werden.
Das Tripeptid BOC-Aib-L-Ala-Aib-OH wurde mit 1,1 Äquivalenten DCC und 2 Äquivalenten HOBt 30 Minuten bei 35°C voraktiviert. Da eine Racemisierung der C-terminalen α-Aminoisobuttersäure nicht auftreten kann, diente die höhere Temperatur zur Reaktionsbeschleunigung. Nach einstündiger Reaktion bei 35°C mit H-L-Ala-Aib-OMe x CF_3COOH, das vorher mit N-Methylmorpholin neutralisiert wurde, wurde noch 15 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Das Pentapeptid BOC-Aib-L-Ala-Aib-Ala-Aib-OMe fiel beim Extrahieren der Essigesterphase mit $NaHCO_3$-Lösung als weißer Niederschlag aus und konnte aus Dichlormethan/Petroläther mit 80 %iger Ausbeute in Form weißer Nadeln isoliert werden. Neben Aminosäure- und Elementaranalyse wurde das Pentapeptid durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie identifiziert (Abb. 3.21). Die Verseifung des Pentapeptidesters zu BOC-Aib-L-Ala-Aib-Ala-Aib-OH wurde wieder in Methanol/1n NaOH (7:3) innerhalb von 2 Stunden bei 35°C durchgeführt. Das nach Kristallisation aus Essigester/1-Butanol mit Petroläther 30-50 in 68 %iger Ausbeute erhaltene Peptid-Fragment A wurde durch Elementaranalyse und Edman-Abbau an fester Phase (71,72) analysiert[+]. Die Sequenz Aib-Ala-Aib-Ala-Aib wurde voll bestätigt.
Der analytische Edman-Abbau diente außer zur Identifizierung verschiedener Fragmente insbesondere zur Sammlung von Erfahrungen in der Abspaltung von sterisch gehinderter α-Aminoisobuttersäure, wie sie für die äußerst schwierige Sequenzierung der natürlichen Analoga Alamethicin (10), Suzukacillin (73) und Trichotoxin (6,38) erforderlich ist.

[+]Herrn Dr. E. Wachter, München, danke ich vielmals für die Durchführung der Messungen.

Die Peptide mit freier Carboxyl- bzw. Säurehydrazidgruppe werden über HOBt/DCC bzw. Diisothiocyanat an die feste Phase verankert. Die endständigen Aminosäuren werden jeweils als Phenylthiohydantoine abgespalten und durch charakteristische Massenzahlen ermittelt. Das Ergebnis der Sequenzierung von BOC-Aib-L-Ala-Aib-Ala-Aib-OH in Abb. 2.4 zeigt die charakteristischen Massenzahlen für Alanin mit $^{m}/e$ = 206 bzw. α-Aminoisobuttersäure mit $^{m}/e$ = 220 in Abhängigkeit von der Peptidposition.

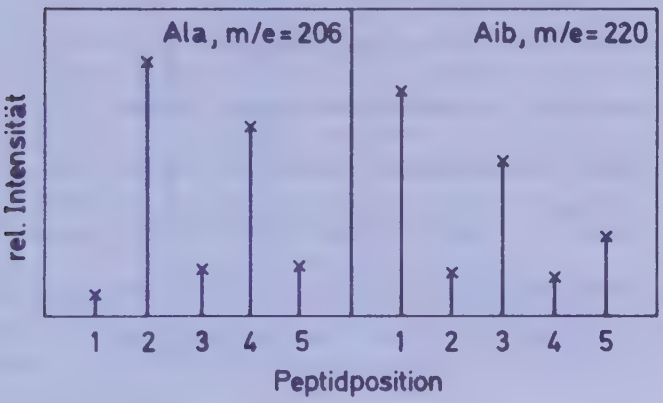


Abb. 2.4 Edman-Abbau von BOC-Aib-L-Ala-Aib-Ala-Aib-OH mit den für Ala bzw. Aib charakteristischen Massenzahlen in Abhängigkeit von der Peptidposition

Es wird deutlich gezeigt, daß sich Alanin in Position 2 und 4 befindet, α-Aminoisobuttersäure dagegen in Position 1, 3 und 5. Der schwache Intensitätsuntergrund von Alanin auf Position 1, 3 und 5 bzw. von α-Aminoisobuttersäure auf Position 2 und 4 ist auf unvollständige Abspaltung zurückzuführen. Man erkennt, daß mit zunehmender Anzahl von Abspaltungsschritten, durch die abnehmende Massenintensität, das Verhältnis Masse zu Untergrund, der sogenannte overlap,

immer ungünstiger wird. Es wird angestrebt, durch Variation der Bedingungen eine möglichst quantitative Abspaltung der Aminosäure zu erhalten.

2.2.3.2. Synthese von H-L-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe (Fragment B)

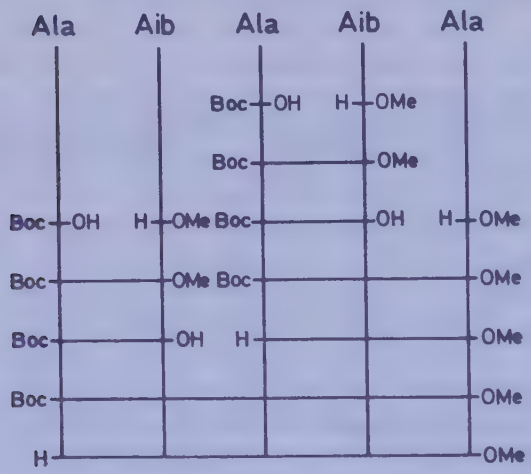


Abb. 2.5 Syntheseschema von H-L-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe x HCl

Zur Synthese des Pentapeptidderivats H-L-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe x HCl wird zweimal das Dipeptid BOC-L-Ala-Aib-OH benötigt, das aus BOC-L-Ala-Aib-OMe durch zweistündige Verseifung bei 40°C in Methanol/1n NaoH (7:3) in 57 %iger Ausbeute erhalten wurde. Da Peptidsäuren mit C-terminalem Aib, wie vorne beschrieben, nur schwer nach der gemischten Anhydrid-Methode aktiviert werden können, erfolgte die Kupplung von BOC-L-Ala-Aib-OH mit H-L-Ala-OMe x HCl nach der HOBt/DCC-Methode in Dimethylformamid. Mit 1,1

Äquivalenten DCC und 1 Äquivalent HOBt wurde 30 Minuten bei 35°C voraktiviert. Die Reaktionszeit betrug 1 Stunde bei 35°C und 15 Stunden bei Zimmertemperatur und führte nach Kristallisation aus Dichlormethan/Methanol mit Petroläther 30-50 zu weißen, ineinander verfilzten Nadeln von BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe in 81 %iger Ausbeute. Neben Elementar- und Aminosäureanalyse wurde das Tripeptid durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie (Abb. 3.16) identifiziert.
Nach Abspaltung der tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe von BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe in 1,2n HCl/Eisessig und Kristallisation aus Methanol/Ether wurde das mit N-Methylmorpholin neutralisierte H-L-Ala-Aib-Ala-OMe x HCl, wie oben für das Tripeptid beschrieben, mit BOC-L-Ala-Aib-OH nach der HOBt/DCC-Methode zum Pentapeptid BOC-L-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe verknüpft. Die Ausbeute betrug 62 % nach Kristallisation aus Essigester/1-Butanol (5:1) mit Petroläther 30-50. Die Aminosäure- und Elementaranalyse stimmte gut mit den berechneten Werten überein. Durch Edman-Abbau der Peptidsäure nach NaOH-Verseifung wurde die Sequenz Ala-Aib-Ala-Aib-Ala bestätigt. Abb. 3.20 zeigt das ^{13}C-NMR Spektrum des Pentapeptids.
Durch Abspaltung der tert-Butyloxycarbonylgruppe mit 1,2n HCl/Eisessig wurde das Pentapeptid schließlich in 97 %iger Ausbeute in H-L-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe x HCl (Fragment B) überführt.

2.2.3.3. Synthese von BOC-Gly-L-Ala-Aib-OH (Fragment C)

Die Methode des gemischten Anhydrids ergab in diesem Fall mit 30 % nur eine geringe Ausbeute. Daher wurden zur Synthese des Tripeptids 1,5 Äquivalente BOC-Gly-OH mit 1,6 Äquivalenten DCC und 3 Äquivalenten HOBt nach Voraktivierung mit 1 Äquivalent H-L-Ala-Aib-OMe x CF_3COOH und 1 Äquivalent N-Methylmorpholin gekuppelt. Das Peptid wurde nach Extraktion und Kristallisation aus Essigester/Petroläther 30-50 in 50 %iger Ausbeute in Form von verfilzten Nadeln erhalten. Neben Aminosäure- und Elementaranalyse wurde das Peptid auch durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie (Abb. 3.14) identifiziert.

Die Methylestergruppe wurde schließlich in Methanol/ 1n NaOH (7:3) bei 35°C in zwei Stunden verseift und nach Kristallisation aus Essigester/Petroläther 30-50 BOC-Gly-L-Ala-Aib-OH in 63 % Ausbeute erhalten.

2.2.3.4. Synthese von H-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Fragment D)

Das Hexapeptidfragment D wurde aus zwei Tripeptidfragmenten zusammengesetzt, von denen beide durch gemischte Anhydridkupplung aus den veresterten C-terminalen Dipeptiden durch Anbau einer N-geschützten Aminosäure dargestellt wurden (Abb. 2.6). Die Kupplung von BOC-L-Pro-OH an H-L-Ala-Aib-OMe x CF_3COOH führte zwar nach der HOBt/DCC-Methode zu einer etwas höheren Ausbeute (Tab. 2.1), wegen der einfacheren Aufarbeitung und Reinigung der Reaktionsprodukte wurde aber die gemischte Anhydridkupplung mit Chlorameisensäureisobutylester und N-Methylmorpholin vorgezogen. Die Ausbeute an öligem, nach Trocknen glasartig erstarrendem Tripeptid betrug 68 %. Das ^{13}C-NMR Spektrum

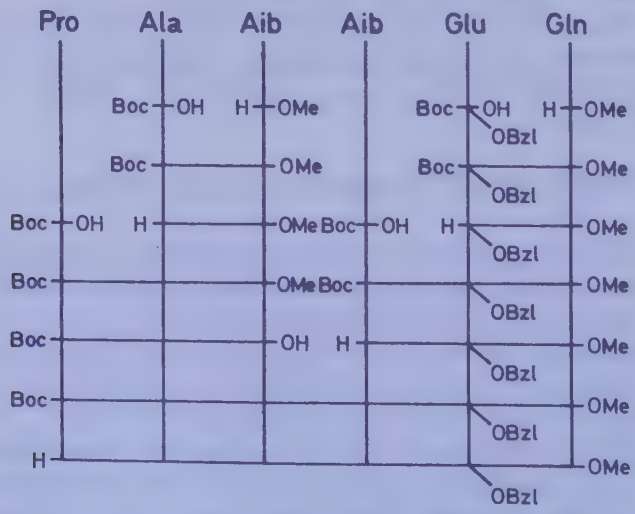


Abb. 2.6 Syntheseschema von BOC-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe

(Abb. 3.15) zeigt neben den durch Z/E-Isomerie aufgespaltenen Signalen des Prolins und der Urethan-Carbonylgruppe auch eine Aufspaltung der C_α- und besonders der C_β-Signale des mit Prolin verknüpften Alanins.
Die anschließende Esterverseifung des Tripeptids zu BOC-Pro-L-Ala-Aib-OH erfolgte durch 3-stündige Reaktion in Methanol/1n NaOH (7:3) bei 35°C mit 40 % Ausbeute.
Von den für das Dipeptid BOC-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe benötigten Aminosäurederivaten, erfolgte die Darstellung von H-L-Gln-OMe x HCl nicht auf direktem Weg in Methanol mit Thionylchlorid, da hierbei ein Reaktionsgemisch von nicht umgesetzter Ausgangssubstanz, H-L-Gln-OMe x HCl und als Hauptprodukt der Dimethylester H-L-Glu(OMe)-OMe x HCl entsteht. Daher wurde ein neues Verfahren zur schonenden Methylestersynthese mittels Methanol/HOBt/DCC (74) eingesetzt. Zuerst mußte jedoch die Zwitterionenstruktur des L-Gln durch Maskierung der Aminofunktion aufgehoben werden. Die Schutzgruppe wurde nach Anlagerung der Methylestergruppe durch 1,2n HCl/Eisessig wieder entfernt. Das auf diese Weise synthetisierte H-L-Gln-OMe x HCl kristallisierte in weißen Nadeln, war dünnschichtchromatographisch rein, stimmte im Schmelzpunkt mit den Literaturwerten gut überein und die Elementaranalyse entsprach den berechneten Werten. Die Ausbeute betrug 62 %, bezogen auf BOC-L-Gln-OH.
Die Synthese von BOC-L-Glu(OBzl)-OH erfolgte nach Drees (75) durch 12-tägige Reaktion mit tert -Butyloxycarbonylazid und Triethylamin in Pyridin. Da die freie Säure jedem Kristallisationsversuch widerstand, wurde sie ins kristalline Dicyclohexylammoniumsalz überführt, dessen Elementaranalyse mit den berechneten Werten und dessen Schmelzpunkt mit den Literaturwerten übereinstimmten.
Die Synthese des BOC-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe erfolgte mit BOC-L-Glu(OBzl)-OH und H-L-Gln-OMe x HCl nach der gemischten Anhydridmethode mit Chlorameisensäureisobutylester und N-Methylmorpholin in 93 %iger Ausbeute zum dünnschichtchromatographisch reinen Dipeptid. Das ^{13}C-NMR-Spektrum konnte im Gegensatz zu den übrigen Spektren aufgrund von Löslichkeitsschwierigkeiten nicht in Methanol,

sondern in Chloroform aufgenommen werden, was zu geringfügig verschobenen Signallagen führte.
Da die Schutzgruppen-Abspaltung von BOC-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe mit 1,2n HCl/Eisessig zu Nebenprodukten führte, wurde eine 30-minütige Abspaltung in Trifluoressigsäure/Dichlormethan (7:3) bei Zimmertemperatur durchgeführt. Aus Methanol/Ether kristallisierte H-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH in Form weißer Nadeln mit 91 % Ausbeute.
Für die Verknüpfung von BOC-Aib-OH mit H-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH wurde bei der gemischten Anhydrid-Kupplung anstelle des sonst verwendeten Chlorameisensäureisobutylesters der Ethylester eingesetzt, um die sterische Hinderung der Reaktion einzuschränken. Nach dreistündiger Gesamtreaktionszeit wird das Reaktionsprodukt durch Extraktion und Kristallisation gereinigt. BOC-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe fällt aus Essigester/Petroläther30-50 in 93 % Ausbeute weiß kristallin. Neben Aminosäure- und Elementaranalyse wurde das vollgeschützte Tripeptid durch ^{13}C-NMR-Spektroskopie (Abb. 3.19) identifiziert.
Nach Abspaltung der tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe von BOC-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe mit Trifluoressigsäure/Dichlormethan (7:3) wurde das in 92 % Ausbeute erhaltene, zäh viskose H-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH mit dem wie beschrieben mit HOBt/DCC voraktivierten BOC-L-Pro-Ala-Aib-OH in Dimethylformamid gekuppelt. Nach 5 Stunden bei 35°C wurde nochmals mit 0,25 Äquivalenten voraktivierter Carboxylkomponente versetzt und 15 Stunden bei Zimmertemperatur weiterreagiert. Nach Extraktion mit Hydrogencarbonat und Citronensäurelösung und Kristallisation aus Essigester/Petroläther 30-50 war das Produkt immer noch stark mit Nebenprodukten verunreinigt, so daß eine Craig-Verteilung über 135 Stufen durchgeführt wurde. Mit dem quarternären Lösungsmittelsystem Essigester/Petroläther 30-50/Methanol/Wasser (2:3:2:3) konnte eine weitgehende Reinigung des Hexapeptids (K = 0,15) erzielt werden. Nur ein Nebenprodukt mit N-terminalem Prolin und ohne Benzylestergruppe, evtl. ein BOC-Pro-Ala-Aib-Nebenprodukt mit

K=0,20, konnte noch nicht entfernt werden. Da sich jedoch die R_F-Werte des Hexapeptids und des Nebenprodukts auf Kieselgelplatten mit Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) als Laufmittel deutlich unterschieden (R_F-Hexapeptid = 0,64; R_F-Nebenprodukt = 0,31), wurde durch Chromatographie über eine Kieselgel-60-Säule das Hexapeptid in 15 %iger Ausbeute rein erhalten. Durch Aminosäure- und Elementaranalyse wurde das in sieben Dünnschichtsystemen reine BOC-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe identifiziert. Das ^{13}C-NMR-Spektrum des Hexapeptids (Abb. 3.23) weist, wie schon das ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-L-Pro-Ala-Aib-OMe (Abb. 3.19), eine durch Z/E-Isomerie am Prolin hervorgerufene Aufspaltung der Pro-, Ala- und BOC-CO-Signale auf.
Nach Behandlung mit Trifluoressigsäure/Dichlormethan (7:3) und Kristallisation aus Methanol/Ether liegt H-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH (Fragment D) dünnschichtchromatographisch rein in 77 % Ausbeute in Form von weißen Kristallen vor.

2.2.4. Fragmentkondensation zum Hexadekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (II)

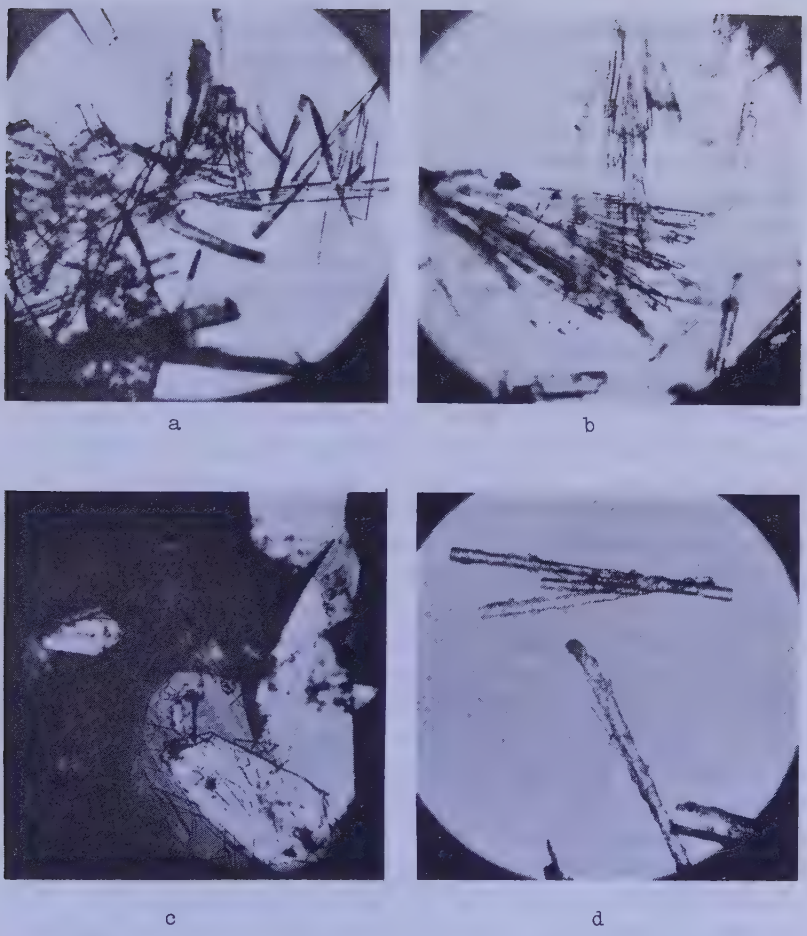
Durch Verknüpfung der Fragmente A + B + D bestand die Möglichkeit, neben dem Nonadekapeptid (Ia) auch das etwas kürzere Hexadekapeptid (II) zu synthetisieren, das ebenfalls schon amphiphilen Charakter besitzt.
Die Verknüpfung von BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OH (Fragment A) mit H-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OMe x HCl (Fragment B) erfolgt mit HOBt/DCC nach der Voraktivierungsmethode. Nach 4 stündiger Reaktion bei 35°C und 20 Stunden bei Zimmertemperatur wurde das Dekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OMe, das nach Kristallisation aus Chloroform/Methanol (2:1) mit Petroläther 30-50 weiße Tafeln, aus Dichlormethan/Methanol (2:1) mit Ether jedoch Nadeln bildet (Abb. 2.7a), in 80 % Ausbeute rein erhalten. Das Dekapeptid wurde nach Identifizierung

durch Elementar- und Aminosäureanalyse mit Methanol/1n NaOH (7:3) innerhalb von 2 Stunden bei Zimmertemperatur verseift und so ins kupplungsfähige Dekapeptidfragment BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH überführt. Neben Elementaranalyse erfolgte eine Überprüfung der Sequenz, die durch Edman-Abbau zu Aib^1-Ala^2-Aib-^{3}-Ala^4-Aib^5-Ala^6-Aib^7-Ala^8-Aib^9-Ala^{10} ermittelt wurde. Abb. 3.22 zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum dieses Sequenzoligomeren.

Zur geplanten Durchführung einer Röntgenstrukturanalyse wurden umfangreiche Kristallisationsversuche durchgeführt. Das Dekapeptid mit freier Carboxylgruppe kristallisierte aus Chloroform/Methanol (2:1) mit Petroläther 30-50 in Form von Nadelbüscheln (Abb. 2.7,b), dagegen aus Dichlormethan/Methanol (2:1) mit Ether als durchsichtige Tafeln (Abb. 2.7,c).

Am besten geeignet für eine Röntgenstrukturanalyse schien uns infolge des relativ schweren Alkali-Atoms das Caesium-Salz BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-O$^-$Cs$^+$. Das durch Neutralisation von BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH mit Cs_2CO_3 erhaltene Salz (76), wurde durch Elementar- und Aminosäureanalyse identifiziert und kristallisierte aus Methanol/Dichlormethan (1:1) mit Ether in Form von weißen Säulen (Abb. 2.7,d).

Die Fragmentkondensation von BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH mit H-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH (Fragment D) wurde ebenfalls mit der HOBt/DCC-Voraktivierungsmethode durchgeführt. Nach Extraktion und Kristallisation aus Dichlormethan/Methanol (1:1) mit Petroläther 30-50 wies das Peptid noch geringe Mengen einer Verunreinigung auf. Diese konnte aufgrund der kleinen Peptidmengen des 10-mikromolaren Reaktionsansatzes durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-Fertigplatten mit Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) als Laufmittel entfernt werden. Nach Elution mit Ethanol wurde das Hexadekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (II) aus Methanol/Dichlormethan mit Petroläther 30-50 in 20 % Ausbeute gefällt und durch Aminosäureanalyse identifiziert.



a b

c d

Abb. 2.7 Kristallaufnahmen verschiedener Dekapeptidderivate

a) BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OMe aus Dichlormethan/ Methanol (2:1) mit Ether

b) BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH aus Chloroform/Methanol (2:1) mit Petroläther 30-50

c) BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH aus Dichlormethan/ Methanol (2:1) mit Ether

d) BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-O$^-$Cs$^+$ aus Dichlormethan/ Methanol (1:1) mit Ether

2.2.5. Fragmentkondensation zum Nonadekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Ia)

Als Carboxylkomponente wurde das schon unter 2.2.4. beschriebene BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH verwendet, während die Aminokomponente durch HOBt/DCC-Kupplung von BOC-Gly-L-Ala-Aib-OH (Fragment C) mit H-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH (Fragment D) dargestellt wurde. Nach Voraktivierung von 1,5 Äquivalenten BOC-Gly-L-Ala-Aib-OH mit 3 Äquivalenten HOBt und 1,6 Äquivalenten DCC für 30 Minuten bei 30°C, wurde 12 Stunden bei 30°C mit 1 Äquivalent Fragment D und 1 Äquivalent N-Methylmorpholin gekuppelt. Danach folgte eine 24-stündige Nachkupplung mit 0,25 Äquivalenten voraktivierter Carboxylkomponente bei Zimmertemperatur. Nach Extraktion und Kristallisation aus Essigester/1-Butanol (5:1) mit Petroläther 30-50 fiel das Nonapeptid BOC-Gly-L-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe in 55 % Ausbeute dünnschichtchromatographisch rein an und wurde durch Aminosäureanalyse identifiziert. Durch Behandlung mit Trifluoressigsäure/Dichlormethan (7:3) wurde H-Gly-L-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH in 92 % Ausbeute dünnschichtchromatographisch rein erhalten. Schließlich wurden 1,5 Äquivalente BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH und 3 Äquivalente HOBt in DMF auf 0°C gekühlt und nach Zugabe von 1,6 Äquivalenten DCC 30 Minuten bei Zimmertemperatur voraktiviert. Nach Zugabe von 1 Äquivalent H-Gly-L-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH und 1 Äquivalent N-Methylmorpholin wurde 12 Stunden bei Zimmertemperatur umgesetzt. Nach Waschen des Reaktionsgemisches mit $NaHCO_3$, Citronensäure und Wasser und Kristallisation aus Essigester/1-Butanol (5:1) mit Petroläther 30-50 wurde das Nonadekapeptid (Ia) mit wenig Dicyclohexylharnstoff und einem weiteren ninhydrinnegativen Peptid-Nebenprodukt erhalten. Über eine 135-stufige Craig-Verteilung konnte im System Essigester/Petroläther 30-50/Methanol/Wasser (1:2:1:2) eine Trennung mit folgenden

Verteilungskoeffizienten erzielt werden:

$K_{\text{Nonadekapeptid (Ia)}} = 1,25$
$K_{\text{Nebenprodukt}} = 0,31$
$K_{\text{Dicyclohexylharnstoff}} = 9,88$

Die Substanz mit K = 0,31 ergab in der Aminosäureanalyse folgende Ergebnisse:

Ala 1,00; Aib 0,98; Gly 0,005; Pro -; Glu 0,01.

Da außerdem keine freie Carboxylgruppe gefunden wurde, handelt es sich um ein Nebenprodukt, das aus dem Dekapeptid BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-OH während der Reaktion gebildet wurde.

BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Ia) wurde nach Kristallisation aus Essigester/1-Butanol (5:1) mit Petroläther 30-50 in 34 % Ausbeute dünnschichtchromatographisch rein erhalten. Die Aminosäureanalyse stimmte gut mit den berechneten Werten überein. Abb. 3.24 zeigt das ^{13}C-NMR-Spektrum des Nonadekapeptids (Ia), das wegen der geringen Substanzmenge (35 mg) zwar kein günstiges Signal-Rausch-Verhältnis zeigt, doch konnten alle auftretenden Signale zugeordnet werden.

Für das Nonadekapeptid (Ia) wurde ein Racemisierungstest+ nach der gaschromatographischen Methode zur Konfigurationsbestimmung von Aminosäuren (77) durchgeführt. Nach Hydrolyse und Derivatisierung zu N-Pentafluorpropionyl-aminosäure-isopropylester wurde an der chiralen Phase N-Propionyl-L-valin-tert-butylamid-polysiloxan eine Enantiomerentrennung durchgeführt. Es ergaben sich folgende Anteile an D-Aminosäuren: 3,2 % D-Ala; 3,0 % D-Pro und 3,7 % D-Glu. Die durch Hydrolyse und Derivatisierung verursachte Racemisierung wurde mit Hilfe reiner L-Aminosäuren ermittelt (57): 1,7 % D-Ala; 3,9 % D-Pro; 3,7 % D-Glu. Somit wurde durch die Synthesebedingungen nur für Alanin eine Racemisierung von maximal 2 % verursacht.

Die γ-Benzylestergruppe des vollgeschützten Nonadekapeptids (Ia) wurde am Palladium-Kohle-Katalysator hydrogenolytisch abgespalten. Nach Kristallisation aus Essigester/Petroläther30-50 wurde das Peptid (Ib) in 88 %iger Ausbeute erhalten und ergab in der Aminosäureanalyse gute

+Herrn G. J. Nicholson, Tübingen, danke ich vielmals für die gaschromatographische Durchführung des Racemisierungstests.

Übereinstimmung mit den theoretischen Werten. Durch die freie γ-Carboxylgruppe von Glu-18 ergab sich die Möglichkeit, die Sequenz mittels Edman-Abbau an fester Phase zu überprüfen.

2.3. Schrittweise Synthese des Tetradekapeptids H-(Aib-L-Ala)$_7$-OPOE am polymeren Träger

Als Modellpeptide für die Konformationsermittlung Aib-reicher Peptide wie Alamethicin, Suzukacillin, Trichotoxin, besonders aber zu konformativen Vergleichen mit dem synthetischen Hexadekapeptid (II) und Nonadekapeptid (Ia,b) sollten Peptidoligomere mit alternierender Aib-L-Ala-Sequenz herangezogen und von (Aib-L-Ala)$_1$ bis (Aib-L-Ala)$_7$ synthetisiert werden. Zur Lösung dieser Problemstellung bot sich der schrittweise Peptidaufbau mit Hilfe der sog. Liquid-Phase-Methode (45,46) am solubilisierenden polymeren Träger Polyoxyethylen (POE) an. Im Vergleich mit der sukzessiven konventionellen Methode ergab sich eine Zeitersparnis, während gegenüber der Solid-Phase-Methode die Möglichkeit der besseren quantitativen Umsatzkontrolle mit variierbarer Nachkupplung gegeben war. Zudem ließen sich die Peptide am solubilisierenden Träger direkt spektroskopisch untersuchen; hierbei konnte sogar Wasser als Lösungsmittel dienen.
Die Synthese wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit bis zum Dekapeptid durchgeführt (47), so daß sie hier nur zusammenfassend beschrieben wird.
Die Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit bifunktionellem Polyoxyethylen (mittlere Molmasse 6000 g/mol) wurde mit fünffach molarem Überschuß von BOC-L-Ala-OH/Dicyclohexylcarbodiimid und einer Gesamtreaktionsdauer von 72 Stunden durchgeführt. Nach beendeter Reaktion wurde aus Ethanol/Ether umgefällt, bis die überschüssigen Kupplungskomponenten entfernt waren.
Die Abspaltung der tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe wurde in 1,2n HCl/Eisessig während 30 Minuten durchgeführt.

Dann wurde wieder aus Ethanol/Ether bis zur dünnschichtchromatographischen Reinheit gefällt. Diese Demaskierung wurde auf jeder Synthesestufe zur Entfernung der Amino-Schutzgruppe wiederholt. Der Sequenzaufbau zum Tetradekapeptid erfolgte in Dichlormethan, indem man jeweils zum polymergebundenen Peptidester-hydrochlorid einen zwei- bis vierfachen Überschuß an voraktivierter Aminosäure gab. Zur Voraktivierung wurden äqumolare Mengen tert-Butyloxycarbonyl-Aminosäure, Dicyclohexylcarbodiimid und 1-Hydroxybenzotriazol 30 Minuten bei 0°C und 30 Minuten bei Zimmertemperatur aufbewahrt und nach Abtrennung des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs zur Peptidester-Lösung gegeben. Die Reaktionszeit betrug zwei Stunden, danach wurde je nach Ergebnis der Umsatzkontrolle bis zu mindestens 98 % Umsatz nachgekuppelt. Gereinigt wurde wieder durch Umkristallisieren aus Ethanol/Ether.
Dieser Reaktionsablauf wiederholte sich auf jeder Stufe der Synthese, deren wichtigste Daten in Tabelle 2.2. wiedergegeben wurden.
Als analytische Methode diente u.a. die potentiometrische Titration (78-80), um jeden Kupplungsschritt auf vollständigen Umsatz überprüfen zu können. Die Aminogruppen der nicht umgesetzten Peptidfragmente am Polymer liegen protoniert vor und können mit 5 x 10^{-3}n Natronlauge am Mikrodosimat titriert werden. Da wegen des bereits erfolgten Umsatzes nur noch wenige freie protonierte Aminogruppen vorliegen, gibt man noch 1 µmol Glycinethylesterhydrochlorid als Standard dazu, um die Wendepunkte genauer bestimmen zu können. Als Vergleichswert wird gegen 1 µmol reinen Standard titriert.
Nach Abspalten der tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe sind alle Aminogruppen des Peptidpolymers protoniert und können analog der Umsatzkontrolle, jedoch ohne Standard, bestimmt werden.
Außer durch Aminosäureanalyse konnten die Peptidpolymere noch durch CD-, ^{13}C-NMR- und FIR-Spektroskopie direkt am polymeren Träger untersucht und identifiziert werden. Die Abbildungen und Ergebnisse werden im spektroskopischen Teil aufgeführt und diskutiert.

Tab. 2.2 Kupplungsbedingungen und Analysen der stufenweisen Synthese des Modellpeptids BOC-(Aib-L-Ala)$_7$-OPOE

Pos.	Amino-säure	Kupplungs-reagenz	molarer Überschuß an BOC-Aminosäure	Kupplungs-dauer (h)	Kupplungs-ausbeute (%)	Beladung des POE (%) Titration	Beladung des POE (%) Aminosäure-analyse	Aminosäure-verhältnisse gef.	Aminosäure-verhältnisse ber.
1	Ala	DCC	5	24					
			2,5	48	-	81	-	-	-
2	Aib	HOBt/DCC	2	2					
			2	2					
			1	2	98	67	65	1:0,94	1:1
3	Ala	HOBt/DCC	2	2					
			2	2					
			1	2	100	67	60	1:0,43	1:0,5
4	Aib	HOBt/DCC	5	1					
			1,5	2					
			1,5	2	98	67	56	1:0,9	1:1
5	Ala	HOBt/DCC	6	2					
			1,5	2	99	67	67	1:0,67	1:0,67
6	Aib	HOBt/DCC	4	1					
			1	2	99	61	66	1:0,96	1:1
7	Ala	HOBt/DCC	6	1					
			1,5	2	98	57	64	1:0,71	1:0,75

Tab. 2.2 Fortsetzung

8	Aib	HOBt/DCC	6	2				
			2	2	99	58	70	1:0,93 1:1
9	Ala	HOBt/DCC	5	1				
			2,5	2	100	63	55	1:0,7 1:0,8
10	Aib	HOBt/DCC	6	1				
			2,5	2	100	60	60	1:0,98 1:1
11	Ala	HOBt/DCC	5	1				
			2,5	1	100	63	52	1:0,8 1:0,83
12	Aib	HOBt/DCC	6	2				
			3	2	100	62	53	1:0,91 1:1
13	Ala	HOBt/ DCC	10	2				
			5	2	99	59	48	1:0,79 1:0,86
14	Aib	HOBt/DCC	10	1				
			5	2	98	-	46	1:1,01 1:1

2.3.1. Hydrazinolyse der Peptid-Polymer-Ester

Die Abspaltung der polymerestergebundenen Peptide erfolgte vom Hexa- bis Nonapeptid mittels Hydrazinolyse (81,82). Das Polyoxyethylen wurde durch Kristallisation aus Ethanol entfernt, anschließend die Peptidhydrazide durch Säulenchromatographie an Kieselgel-60 und Kristallisation aus Ethanol/Ether dünnschichtchromatographisch rein erhalten.
Die Verbindungen BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-NH-NH$_2$; BOC-(Aib-L-Ala)$_4$-NH-NH$_2$ und BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-NH-NH$_2$ stimmten in der Aminosäureanalyse mit den berechneten Werten gut überein. Eine Identifizierung von BOC-(Aib-L-Ala)$_4$-NH-NH$_2$ erfolgte zusätzlich mittels ^{13}C-NMR-Spektroskopie (Abb. 3.13) und BOC-(Aib-L-Ala)$_3$-NH-NH$_2$ konnte durch Edman-Abbau an fester Phase nachgewiesen werden.

3. Konformationsstudien

3.1. Circulardichroismus

Bei Anwesenheit asymmetrischer Zentren in Nachbarschaft zum Chromophor eines Moleküls beobachtet man eine unterschiedliche Absorption von links- und rechtscircular polarisiertem Licht. Dieses chiroptische Phänomen wird als Circulardichroismus (CD) bezeichnet. Die asymmetrische Umgebung des Carbonylchromophors der Peptidbindung führt im fernen UV zu zwei CD-aktiven Elektronenübergängen, einem relativ schwachen $n\pi^+$-Übergang und einem starken $\pi\pi^+$-Übergang. Da die Wechselwirkung des Lichtes mit den Elektronen der Peptidcarbonylgruppe von der Anordnung dieses Chromophors gegenüber anderen Molekülteilen abhängt, bietet der Circulardichroismus die Möglichkeit, die verschiedenen Sekundärstrukturen der Peptide und Proteine zu unterscheiden und zu analysieren (33).
Durch Messung von Poly-α-aminosäuren, deren Backbone jeweils in nur einer Konformation vorliegt, fand man einen negativen Circulardichroismus der rechtshändigen α-Helix bei 223 nm, der durch den $n\pi^+$-Übergang der Peptidbindung verursacht wird (83). Der stark positive Circulardichroismus der α-Helix bei 192-194 nm und der negative bei 206-208 nm sind auf den $\pi\pi^+$-Übergang zurückzuführen, welcher in zwei Komponenten aufgespalten ist. Das Auftauchen zweier Cotton-Effekte von umgekehrtem Vorzeichen im Spektralbereich von 190-210 nm wird als "exciton-splitting" bezeichnet und stellt ein CD-Charakteristikum für α-helikale Konformation dar. Es konnte gezeigt werden, daß die Resonanzwechselwirkung des gleichen Peptidchromophors parallel und senkrecht zur Helixachse zu der Aufspaltung der Peptidabsorptionsbande führt (84,85). Polypeptide in antiparalleler ß-Konformation weisen bei 215-220 nm ein Minimum im CD-Spektrum auf, das dem $n\pi^*$-Übergang zugeordnet werden kann (86), während der $\pi\pi^*$-Übergang als Elliptizitätsmaximum bei 195 nm beobachtet wird.

Schwieriger wird die Zuordnung bei der ungeordneten Sekundärstruktur, die im weiteren als ϱ-Konformation bezeichnet wird (87). Die als Modelle herangezogenen Polyaminosäuren weisen eine statistische, ungeordnete Konformation (random coil) auf, die sich von der irregulären, nicht periodischen aber fixierten Konformation in Proteinen unterscheidet. So beobachtet man zwei Grundtypen von CD-Spektren für die ϱ-Konformation. Bei einem Typ treten zwei CD-Übergänge mit entgegengesetztem Vorzeichen auf, während im Spektrum des anderen nur negative Elliptizitäten gefunden werden (88).

Die Problematik der Heranziehung des Circulardichroismus zur Sekundärstruktur-Bestimmung liegt bei gleichzeitigem Auftreten mehrerer Konformationsbereiche innerhalb eines Peptids in der richtigen Interpretation des überlagerten Gesamtspektrums. Man vergleicht dabei die gemessenen Elliptizitäten mit Elliptizitäten, die durch Linearkombination der Standardelliptizitäten von α-Helix, ß- und ϱ-Konformation erhalten werden. Von den Standards abweichende Konformationen, wie ß-Turns (89), 3_{10}-Helix (90,91) und andere gestörte Helices werden also vernachlässigt. Zudem werden die Standard-Elliptizitäten aus Poly-α-aminosäuren bzw. Proteinen erhalten, die beide für unsere relativ kurzkettigen Peptide, mit hohem Anteil achiraler α-Aminoisobuttersäure nur bedingt geeignet erscheinen. Es wurden deshalb zur Auswertung der CD-Spektren Peptidmodelle gesucht, mit deren Hilfe der α-helikale Bereich der synthetisierten Hexadeka (II)- und Nonadekapeptide (Ia) abgeschätzt werden kann. Hierzu bieten sich Oligomere mit alternierender Aib-L-Ala-Sequenz an, da diese im N-terminalen Bereich der synthetisierten Peptidanaloga (Ia,b und II) die Ausbildung der helikalen Konformation bewirken. Solche Oligomere wurden bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (47) durch stufenweise Peptidsynthese am solubilisierenden Träger Polyoxyethylen (POE) bis zum Dekapeptid BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-OPOE dargestellt. Mit dieser Peptidserie konnten die Cotton-Effekte der natürlichen

Peptidantibiotika allerdings nicht ganz erreicht werden, daher sollten längere Oligomere bis zum Tetradekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_7$-OPOE synthetisiert und das Konformationsverhalten der wachsenden polymerveresterten Peptidkette durch CD-Messung untersucht werden.

3.1.1. CD-Spektren

Die CD-Spektren der N-geschützten Copolymere BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE (n = 1-7) und BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_m$-OPOE (m = 1-6) wurden unter gleichen Bedingungen in Ethanol aufgenommen (Abb. 3.1). Das Dipeptid BOC-Aib-L-Ala-OPOE (2) weist mit einem CD-Maximum bei 217 nm und einem Minimum bei 195 nm bereits einen qualitativ ähnlichen Kurvenverlauf auf, wie er für die α-Konformation von Poly-L-Lysin gefunden wurde (92). Beim Übergang zum Tripeptid BOC-L-Ala-Aib-Ala-OPOE (3) bleibt das Maximum bei 217 nm unverändert, dagegen tritt bei 197,5 nm ein neues sehr intensives Elliptizitätsmaximum mit Schulter bei 204 nm auf. Dieser Kurvenverlauf kann durch einen ß-Turn erklärt werden (93,94). Bei dieser Konformation faltet sich die Peptidkette zu sich selbst zurück und bildet Wasserstoffbrücken zwischen der Carboxylgruppe der Aminosäure i und der Aminogruppe der Aminosäure i + 3. Im Falle des vorliegenden Tripeptids ist ein solcher ß-Turn nur unter Einbeziehung der Urethancarbonylgruppe möglich. Ein Vergleich mit theoretisch berechneten CD-Spektren verschiedener ß-Turns von Woody (89) und mit CD-Messungen von Fasman (95) an einem ß-Turn-Modellpeptid, führt zu einer guten Übereinstimmung der positiven Cotton-Effekte bei 197,5 nm und 204 nm. Venkatachalam (96) klassifizierte die unterschiedlichen räumlichen Anordnungen der ß-Turns durch Einteilung in drei Grundtypen, I-III, die bei ähnlicher Lage ihrer Extrema vor allem Unterschiede in den CD-Intensitäten aufweisen. Das gemessene N-geschützte Tripeptid (3) stimmt im kurzwelligen Bereich am besten mit dem Typ III der ß-Turns überein, der einer Windung einer 3_{10}-Helix entspricht.

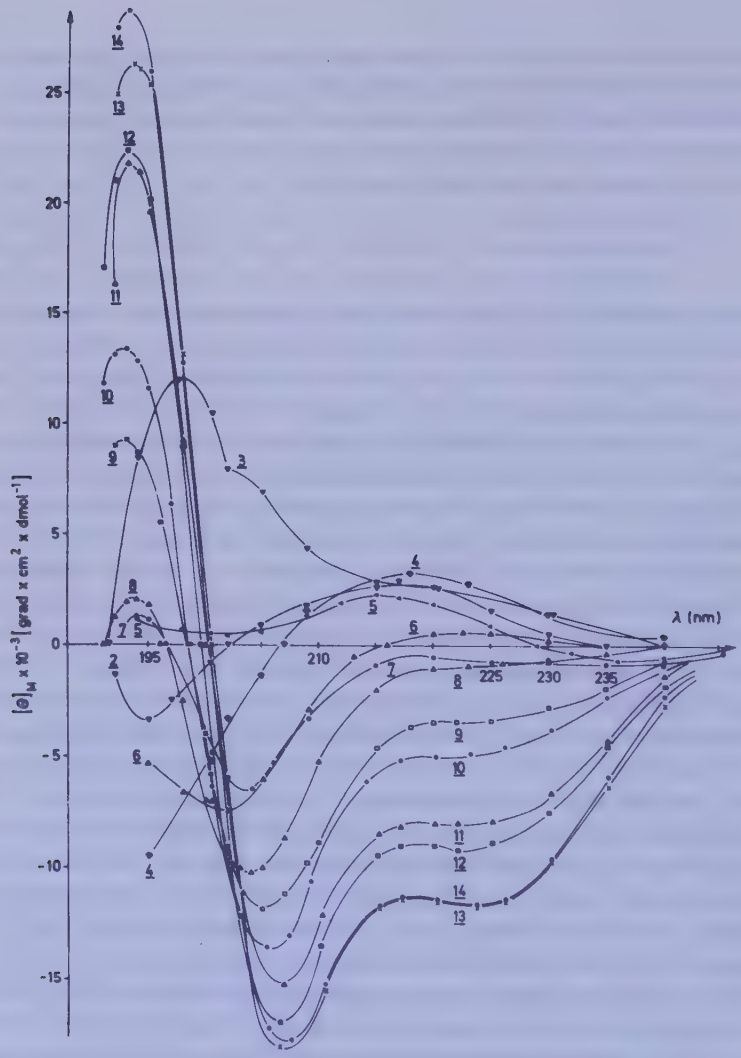


Abb. 3.1 CD-Spektren der N-tert-Butyloxycarbonyl-geschützten Di- bis Tetradekapeptid-Polyoxyethylenester BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_n$-OPOE (n = 1-7) und BOC-L-Ala-$(Aib\text{-}Ala)_m$-OPOE (m = 1-6). Die Zahlen der Kurven geben die Gesamtzahl von Aminosäureresten jedes Peptids an. T = 25°C; C = 5×10^{-4} mol/l in Ethanol 95 %.

Nach Abspaltung der Aminoschutzgruppe kann das Tripeptid H-L-Ala-Aib-Ala-OMe [3] keinen ß-Turn mehr bilden und tatsächlich fehlen im CD-Spektrum dieser Verbindung (Abb. 3.2) die intensiven Elliptizitätsmaxima im kurzwelligen Bereich. Der positive Circulardichroismus bei 217 nm besitzt dagegen für das N-protonierte [3] und N-geschützte (3) Tripeptid angenähert gleiche Intensität. Der Backbone des N-protonierten Tetrapeptids H-(Aib-L-Ala)$_2$-OPOE [4] in Abb. 3.2 bietet durch die zusätzliche Aminosäure wieder die Voraussetzungen zur Ausbildung eines ß-Turns. Das Maximum bei 204 nm wird auch innerhalb der Fehlergrenzen in gleicher Intensität wiedergefunden wie im Tripeptid (3) in Abb. 3.1, dagegen fehlt das intensive Maximum bei 197,5 nm vollständig.

Beim weiteren Aufbau der N-geschützten Copolymere bis zum Hexapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_3$-OPOE (6), (Abb. 3.1), zeigt sich im langwelligen Bereich eine kontinuierliche Abnahme des positiven Cotton-Effekts. Ferner beobachtet man beim Hexapeptid (6) eine Rotverschiebung um 8 nm. Dagegen ändert sich das CD-Spektrum dieser Serie im kurzwelligen Teil diskontinuierlich, je nachdem ob BOC-Ala-OH oder das durch die Schutzgruppe sehr sperrige BOC-Aib-OH N-terminal angebaut werden. Das Tetrapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_2$-OPOE (4) weist unterhalb 207 nm negative Elliptizitäten auf, das Pentapeptid BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OPOE (5) mit N-terminalem BOC-L-Ala zeigt dagegen einen in diesem Bereich stets positiven Verlauf, wenn auch die intensiven Cotton-Effekte des Tripeptids (3) fehlen. Das Spektrum des Hexapeptids BOC-(Aib-L-Ala)$_3$-OPOE (6) läßt sich mit seinem ausgeprägten Minimum bei 202 nm und dem schwachen Maximum bei 222,5 nm bereits mit der ρ-Konformation von Poly-L-Lysin vergleichen (92). Der starke Einfluß des N-terminalen BOC-Aib bei diesen kurzkettigen Peptiden wird noch offensichtlicher, wenn in den Spektren (2-6) (Abb. 3.1) die beiden Peptide (3) und (5) mit N-terminalem BOC-L-Ala durch die ebenfalls alternierende Sequenzen aufweisenden Tri- bzw. Pentapeptide BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe bzw. BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OMe ersetzt werden (Tab. 3.1). Man kann

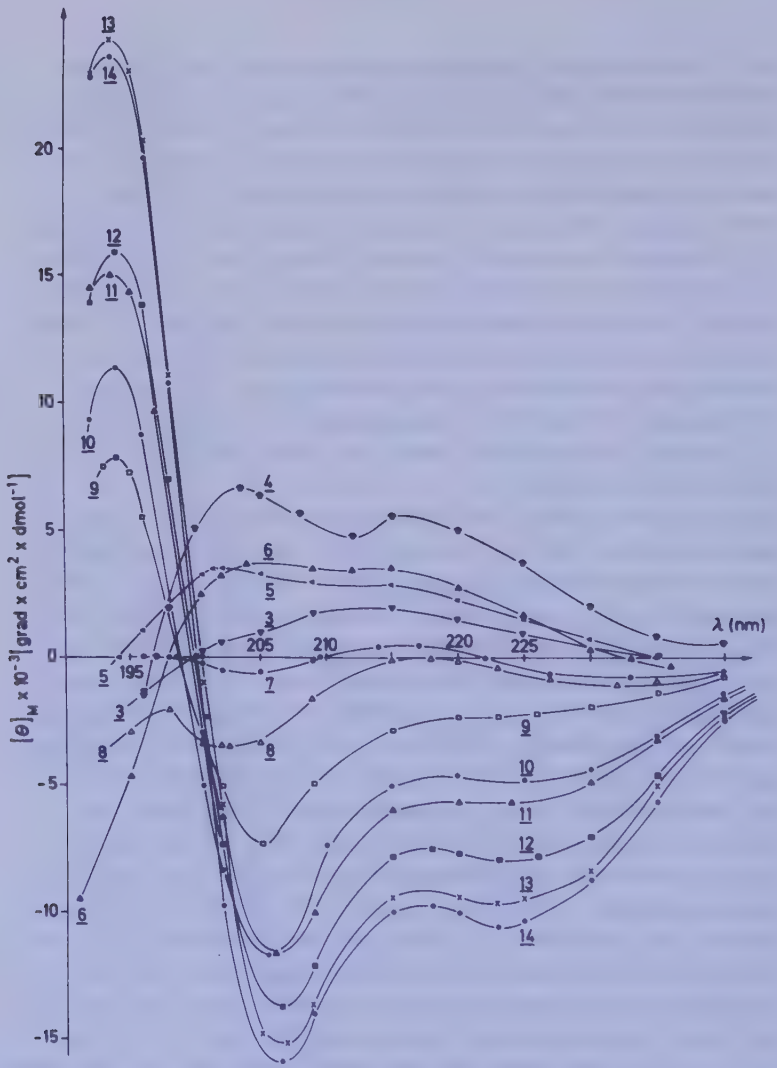


Abb. 3.2 CD-Spektren der N-protonierten Tri- bis Tetradekapeptid-Polyoxyethylenester H-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE (n = 2-7) und H-L-Ala-(Aib-Ala)$_m$-OPOE$_4$ (m = 1-6) Aufnahmebedingungen wie in Abb. 3.1.

in den CD-Spektren dieser Peptid-Serie mit jeweils N-terminalem BOC-Aib keine diskontinuierlichen Konformationswechsel mit steigender Kettenlänge und keine Anzeichen für ß-Turns erkennen, sondern man beobachtet kontinuierliche Änderungen der Spektrenformen, die alle der φ-Konformation entsprechen. Daß dieser direkte Vergleich von Polyoxyethylen- und Methylestern der Peptide zulässig ist, konnte experimentell bewiesen werden und wird später in Abb. 3.6 gezeigt.

Tab. 3.1. CD-Extrema einer wachsenden Peptidkette mit alternierender Aib-L-Ala-Sequenz, jeweils mit N-terminalem BOC-Aib

Peptid	$[\Theta]_M \times 10^{-3}$ Grd·cm²/dmol	λ nm	$[\Theta]_M \times 10^{-3}$ Grd·cm²/dmol	λ nm
BOC-Aib-L-Ala-OPOE (2)	- 3,40	195	+2,83	217
BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe	-10,12	200	---	---
BOC-(Aib-L-Ala)$_2$-OPOE (4)	- 9,5	195	+3,15	218
BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OMe	- 9,6	200	+1,00	225
BOC-(Aib-L-Ala)$_3$-OPOE (6)	- 7,42	202	+0,60	222,5

Beim Vergleich der CD-Spektren der Peptid-Serie in Tab. 3.1 mit den Spektren (2) bis (6) in Abb. 3.1 findet man eine viel stärkere Konformationsabhängigkeit bei Änderung der Sequenz am N-Terminus als am C-Terminus.
Beim N-geschützten Heptapeptid BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-OPOE (7) zeichnet sich im CD-Spektrum mit dem erstmaligen Auftreten des "exciton splitting" des $\pi\pi^+$-Überganges bei 194 nm (+) und 204 nm (-) ein Wechsel zur α-helikalen Konformation ab, wenn auch der $n\pi^+$-Übergang bei 235 nm noch stark langwellig verschoben ist und nur eine sehr geringe Intensität aufweist. Mit weiter wachsender Peptidkette findet man beim Nonapeptid BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-OPOE (9) bereits einen schwachen $n\pi^+$-Übergang bei 223 nm; der negative Anteil des $\pi\pi^+$-Überganges liegt bei 206,5 nm, der positive bei 193,5 nm. Das Nonapeptid (9) verfügt also bereits über einen signifikanten α-Helix-Bereich, der bei weiterem Anbau von Aminosäuren bis zum Tetradekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_7$-OPOE

(14) immer stärker dominiert.
Bei den N-protonierten Peptiden (Abb. 3.2), deren kleinste Spezies [3] und [4] bereits im Vergleich zu den N-geschützten Peptiden besprochen wurden, führt die Entfernung der sperrigen Amino-Schutzgruppe zu einer weniger starken Intensitätsänderung der CD-Spektren mit wachsender Peptidkette. So tritt auch beim Pentapeptid H-L-Ala-$(Aib-Ala)_2$-OPOE [5] und Hexapeptid H-$(Aib-L-Ala)_3$-OPOE [6] ein CD-Maximum bei 201,5 bzw. 204 nm auf, das durch einen ß-Turn erklärt werden kann. Das CD-Spektrum des Heptapeptids H-L-Ala-$(Aib-Ala)_3$-OPOE [7] fällt durch den häufigen Vorzeichenwechsel seiner Cotton-Effekte auf. Mit einem Minimum bei 233 nm, Maximum bei 217 nm, erneutem Minimum bei 205 nm und Nulldurchgang bei 196 nm läßt es sich am ehesten in die von Woody (89) berechnete Klasse D für ß-Turn-Spektren einordnen, obwohl die Intensitäten viel schwächer sind. Das N-protonierte Octapeptid H-$(Aib-L-Ala)_4$-OPOE [8] weist ähnlich dem Heptapeptid [7] , jedoch mit größeren Elliptizitäten, je ein Minimum bei 232 nm und 202,5 nm auf; allerdings wird das Maximum bei 217 nm nicht mehr positiv ausgebildet. Ab dem Nonapeptid H-L-Ala-$(Aib-Ala)_4$-OPOE [9] findet man dann wieder das "exciton splitting" des $\pi\pi^+$-Überganges und einen $n\pi^+$-Übergang bei 223 nm als α-Helix-Charakteristikum.
Wie bei den N-geschützten Peptiden steigen die Intensitäten der für die α-Helix typischen CD-Extrema bis zum Tetradekapeptid H-$(Aib-L-Ala)_7$-OPOE [14] immer weiter an. Es wird allerdings bei gleicher Kettenlänge für die N-geschützten Peptide stets ein intensiverer Cotton-Effekt gefunden als für die N-protonierten. Dies läßt sich durch die positive Ladung am N-Terminus erklären, welche eine höhere Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel verursacht und zu einer geringeren Stabilität der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der α-Helix führt. Vergleicht man die CD-Spektren der Serie BOC-$(Aib-L-Ala)_n$-OPOE mit denen der Serie BOC-$(L-Ala)_n$-OPOE (55), so zeigen sich bei beiden ähnliche α-helikale CD-Charakteristika ab dem Nonapeptid. Betrachtet man dagegen die Peptidserien mit

mit freier Aminogruppe, so findet man bei H-$(L\text{-}Ala)_n$-OPOE für n = 9 und 10 charakteristische CD-Spektren der ß-Konformation, dagegen bei H-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_n$-OPOE ab dem Nonapeptid bereits einen signifikanten α-Helix-Anteil, der mit zunehmender Peptidlänge anwächst. Dies spricht für eine stärker helixstabilisierende Wirkung der α-Aminoisobuttersäure gegenüber Alanin. Diese Tendenz wird nach Konformations-Berechnungen an Poly-α-Aminoisobuttersäure erwartet (97). Weitere Stabilitätskriterien der Konformation sind durch Ermittlung der Temperatur-, Konzentration- bzw. Lösungsmittelabhängigkeit der CD-Spektren möglich. Für die Oligomeren BOC-$(L\text{-}Ala)_n$-OMe (n = 2-7) (98) wird in Ethanol ab dem Pentameren, in Trifluorethanol ab dem Heptameren ein Wechsel zur ß-Konformation beobachtet, der sich durch Konzentrationsabnahme bzw. Temperaturerhöhung wieder rückgängig machen läßt. Ähnliche Konformationsänderungen findet man auch bei BOC-$(L\text{-}Ala)_n$-Gly-OPOE (99). Die Modellpeptide BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_n$-OPOE ergeben jedoch für das Dekapeptid (n = 5) und Tetradekapeptid (n = 7) nur einen geringen Temperatureinfluß und eine Beibehaltung der helikalen Konformation auch bei 50°C. In Abb. 3.3 ist die Temperaturabhängigkeit der Elliptizitäten dieser Peptide bei 223 nm im Vergleich zum Alamethicin dargestellt. Ferner findet man bei der Änderung der Peptidkonzentration für BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-OPOE zwischen $1{,}5 \times 10^{-3}$ mol/l und 5×10^{-5} mol/l stets eine Beibehaltung der Helix-Konformation mit nur geringen kontinuierlichen Änderungen der Elliptizitäten ($\Delta[\Theta]_{223}$ = 730 Grd·cm^2/dmol bei Konzentrationszunahme um eine Zehnerpotenz).

Die Stabilität der Konformation in Abhängigkeit vom Lösungsmittel ist für BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-OPOE in Abb. 3.4 dargestellt. In den organischen Lösungsmitteln Ethanol und Trifluorethanol sowie in Ethanol/Wasser (1:1) erfährt das CD-Spektrum nur geringe Intensitätsänderungen der Cotton-Effekte bei 193 nm (+), 206 nm (-) und 223 nm(-) und stimmt überein mit den Untersuchungen an Alamethicin (10). Dagegen

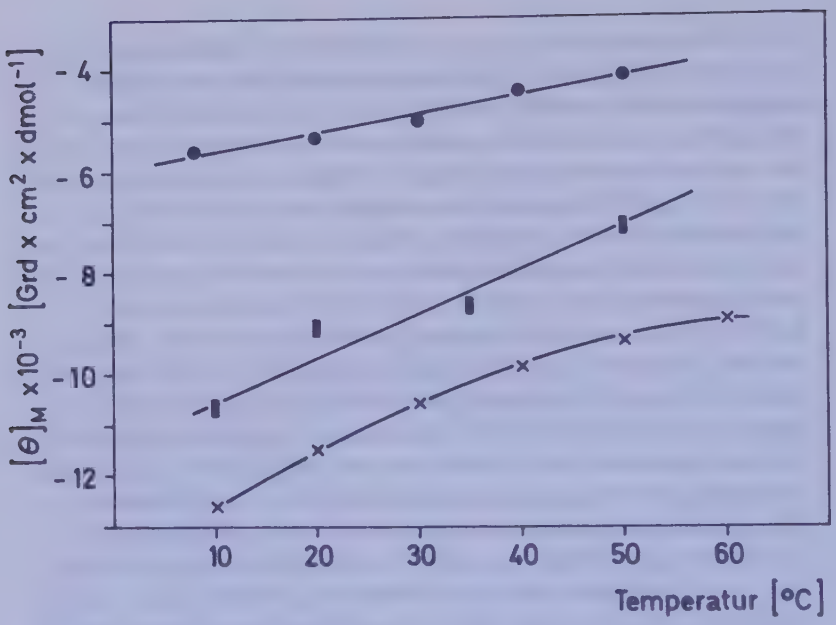


Abb. 3.3 Temperaturabhängigkeit der Elliptizitäten bei 223 nm für BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OPOE (●), BOC-(Aib-L-Ala)$_7$-OPOE (■) und Alamethicin F-50 (x) in Ethanol 95 %, C = 5 x 10^{-4} mol/l.

erfolgt für das Modellpeptid in Wasser ein Übergang der teilweise helikalen Konformation zur vollständigen ρ-Konformation. Diese Änderung tritt bei Alamethicin nicht auf, doch sollte bei diesem Vergleich die starke Tendenz von Alamethicin zur Micellenbildung in neutralen wässrigen Lösungen berücksichtigt werden.

Zur Identifizierung wurden einige N-geschützte Peptide durch Hydrazinolyse vom Polymer abgespalten. Die CD-Spektren von BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-NH-NH$_2$, BOC-(Aib-L-Ala)$_4$-NH-NH$_2$ und BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-NH-NH$_2$ in Abb. 3.5 zeigen im qualitativen Verlauf eine gute Übereinstimmung mit den CD-Spektren der entsprechenden N-geschützten Hepta-, Octa- bzw. Nonapeptidpolymerester. Es fällt jedoch auf, daß die Elliptizitäten und somit auch der Helix-Anteil der Peptidhydrazide stets größer sind, als die der vergleichbaren Peptid-Polymerester.

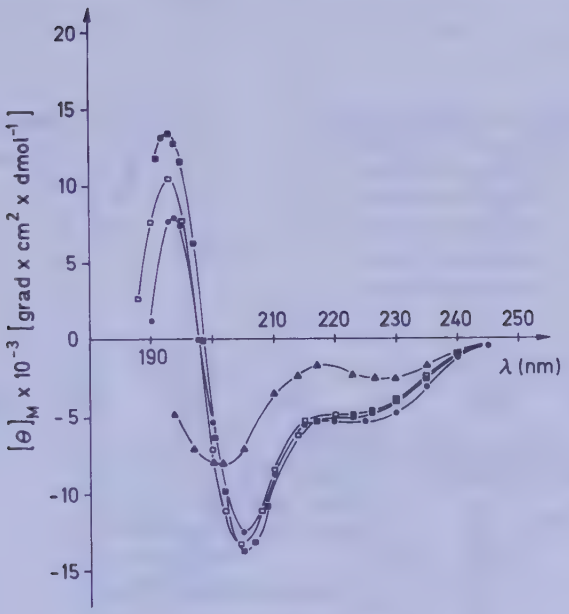


Abb. 3.4 Lösungsmittelabhängigkeit des Circulardichroismus von BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OPOE in Ethanol 95 % (□), Trifluorethanol (■), Ethanol (50%) (●) und Wasser (▲). T = 25°C, C = 5 x 10^{-4} mol/l.

Diese Helixstabilisierung der Peptidhydrazide wird auch noch durch das ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-(Aib-L-Ala)$_4$-NH-NH_2 (Abb. 3.13) bestätigt. Eine Helixstabilisierung durch das fehlende Polymer läßt sich ausschließen, da die Zugabe äquimolarer Mengen Polyoxyethylen zum Nonapeptidhydrazid keine wesentliche Änderung des CD-Spektrums bewirkt (Abb. 3.5,c). Als mögliche Erklärung für die beobachtete Helixstabilisierung bietet sich eine zusätzliche Ausbildung von Wasserstoffbrücken der Peptidcarbonyle mit der Hydrazidgruppe an.

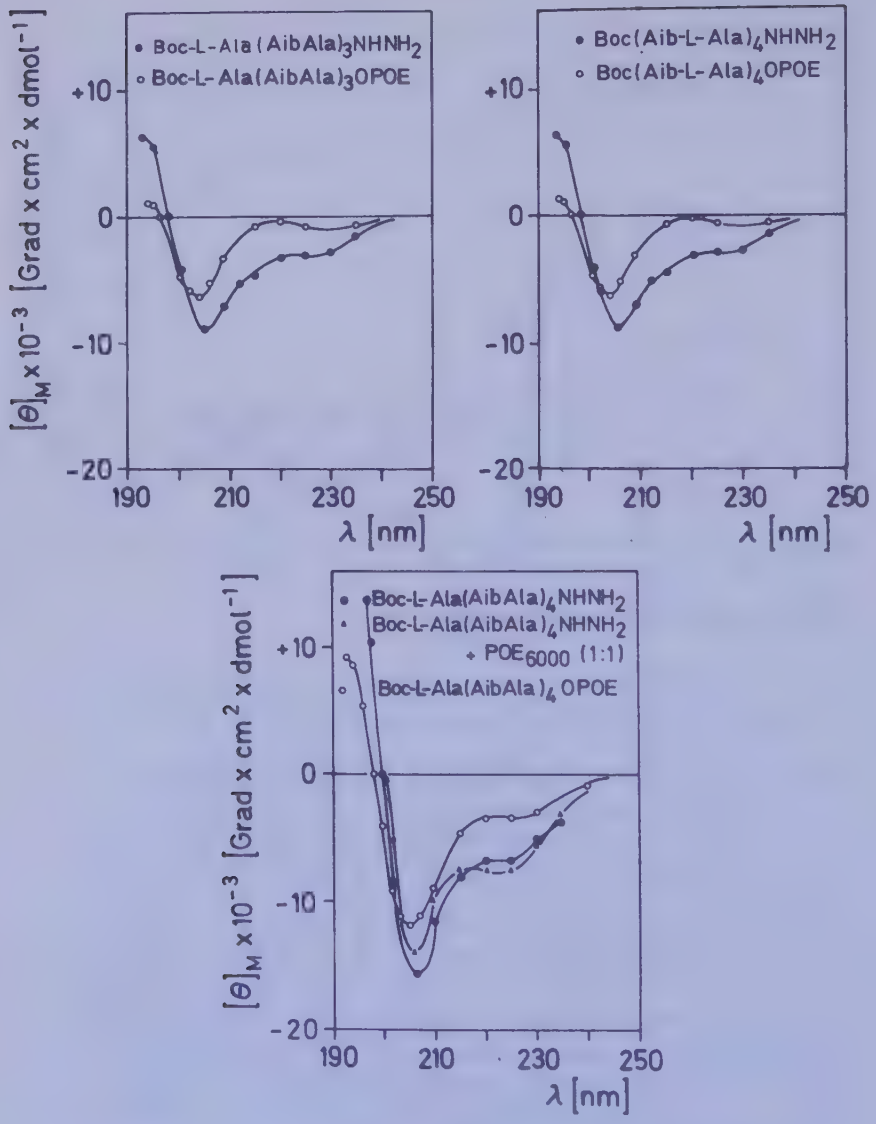


Abb. 3.5 CD-Spektren der Peptidhydrazide BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-NH-NH$_2$; T = 25°C; C = 5 x 10^{-4} mol/l in Ethanol 95 %.

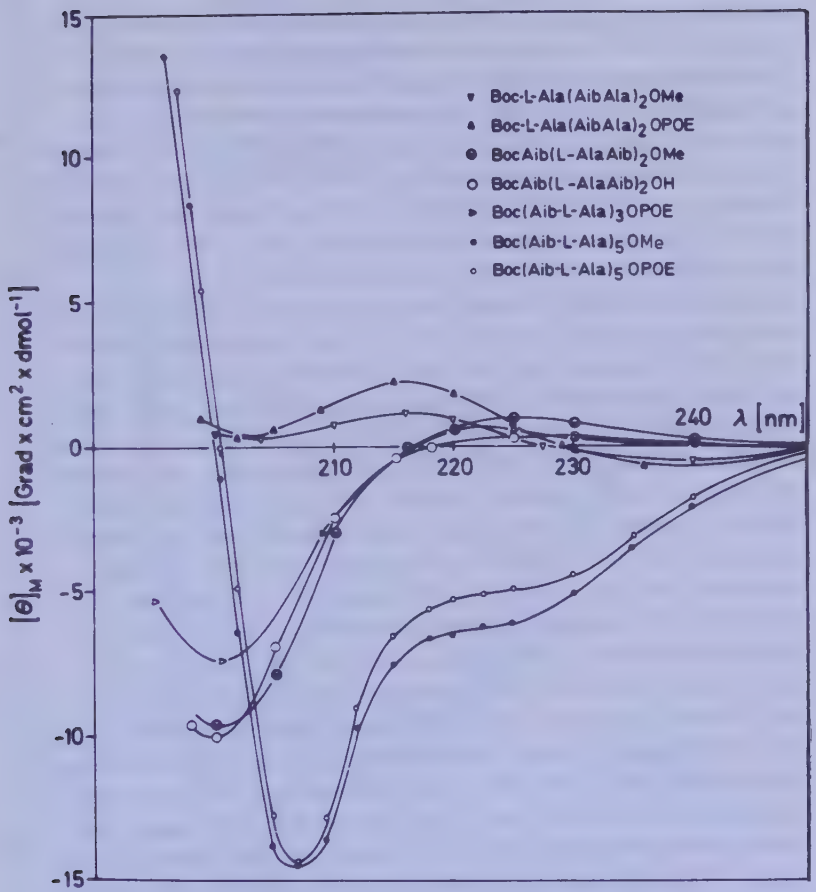


Abb. 3.6 Vergleich der CD-Spektren von BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_2$-OPOE (▲) mit BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_2$-OMe (▽); Boc-$(Aib-L-Ala)_3$-OPOE (▷) mit BOC-Aib-$(L-Ala-Aib)_2$-OMe (●) und BOC-Aib-$(L-Ala-Aib)_2$-OH (○); BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-OPOE (◦) mit BOC-Aib-L-$Ala)_5$-OMe (•). T = 25°C; C = 5 x 10^{-4} mol/l in Ethanol 95 %.

Um die Verwendbarkeit der Peptide am polymeren Träger als CD-Modellverbindung zu überprüfen, wurde ein CD-spektroskopischer Vergleich zwischen stufenweise am polymeren Träger und völlig unabhängig auf konventionelle Weise synthetisierten Peptiden durchgeführt (Abb. 3.6). Es ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung von BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_2$-OMe mit BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_2$-OPOE und BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-OMe mit BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-OPOE; die beiden letzteren Peptide weisen bereits partielle α-Helix-Konformation auf. Die Beobachtungen stimmen überein mit den an BOC-$(L-Glu)_n$-Gly-OPOE-Serien erhaltenen Ergebnissen (100).
Die Studien führen zu dem Schluß, daß das C-terminale Ende nur einem geringen Einfluß auf die Peptidkonformation ausübt, wenn es nicht wie bei den Hydraziden konformationsstabilisierend wirkt. Dies wird noch bestätigt durch den Vergleich des Methylesters BOC-Aib-$(L-Ala-Aib)_2$-OMe mit der entsprechenden Peptidsäure BOC-Aib-$(L-Ala-Aib)_2$-OH, deren Spektren sich gut decken; selbst der im N-Terminus identische, jedoch im C-Terminus stark unterschiedliche Polymerester BOC-$(Aib-L-Ala)_3$-OPOE stimmt noch gut mit den Pentapeptiden überein. Abb. 3.7 zeigt die CD-Spektren der konventionell synthetisierten Peptide BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (II) und BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Ia) in Ethanol. Zum Vergleich sind die CD-Spektren der zu den Fragmentkondensationen eingesetzten Peptide BOC-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe, BOC-Gly-L-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe und BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-OMe abgebildet. Sowohl das Hexapeptid als auch das Nonapeptid weisen weder im $n\pi^*$-Übergang bei 237,5 bzw. 232,5 nm noch im $\pi\pi^*$-Übergang bei 198 bzw. 206 nm einen α-helikalen Sequenzbereich auf. Dieser ist im Dekapeptid, wie bereits in Abb. 3.6 gezeigt, schon deutlich ausgeprägt. Das CD-Spektrum des Hexadekapeptids (II) mit dem backbone-verändernden Prolin in Position 11 ist ähnlich dem Spektrum des N-terminal darin enthaltenen Dekapeptids BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-OMe, wenn auch die $n\pi^*$-bzw.

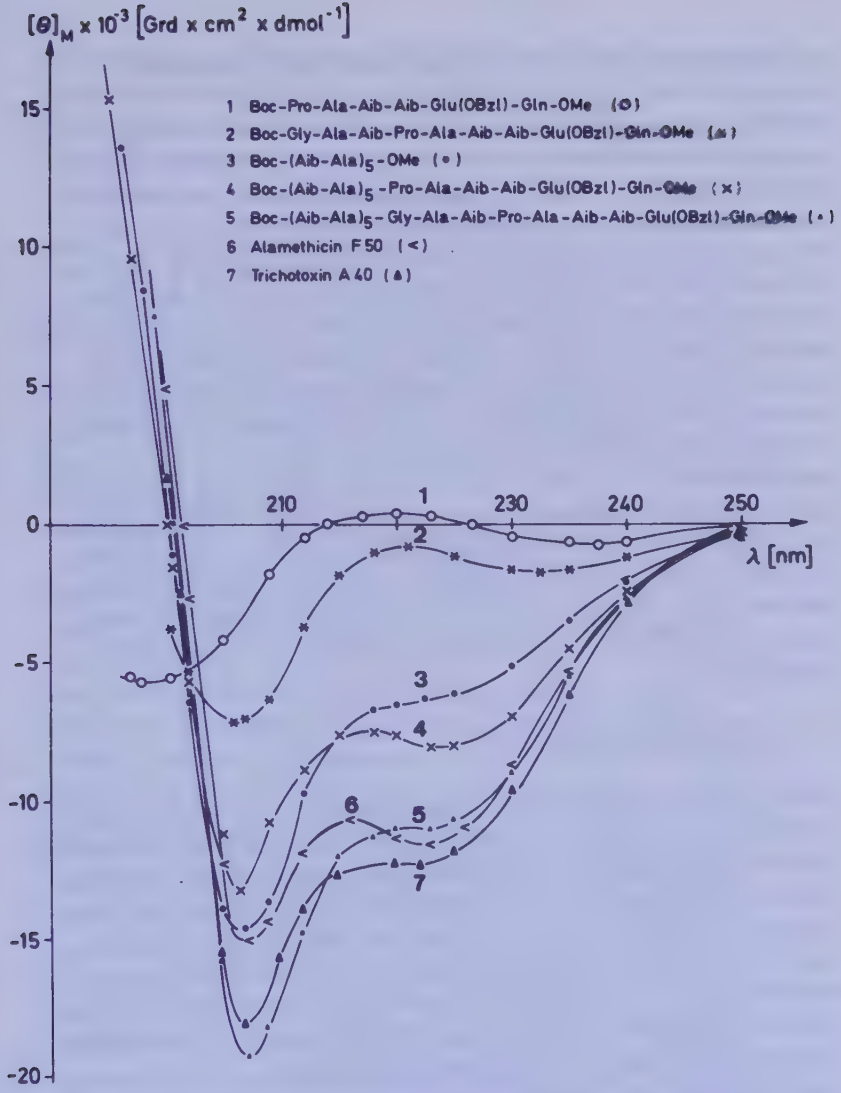


Abb. 3.7 CD-Spektren der synthetisierten Peptide und einiger Peptid-Fragmente im Vergleich zu Alamethicin F-50 und Trichotoxin A-40; T = 25°C; C = 5 x 10^{-4} mol/l in Ethanol 95 %.

$\pi\pi^+$-Übergänge jeweils von unterschiedlicher Intensität sind.
Das Nonadekapeptid (Ia) zeigt dagegen eine starke Intensitätszunahme des Circulardichroismus und damit eine Erhöhung des α-Helix-Gehaltes gegenüber dem Dekapeptid. Das Spektrum ist eher vergleichbar mit denjenigen der beiden Modellpeptide BOC-L-Ala-$(Aib\text{-}Ala)_6$-OPOE und BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_7$-OPOE (Abb. 3.1), die bei 207 nm einen geringeren und bei 223 nm einen stärkeren Cotton-Effekt aufweisen als das Nonadekapeptid (Ia). Der Vergleich mit dem natürlichen Alamethicin F-50 ergibt beim $n\pi^+$-Übergang eine gute Übereinstimmung mit dem synthetischen Peptid (Ia), während beim $\pi\pi^+$-Übergang das Syntheseprodukt etwas größere Elliptizitäten aufweist.
Das Nonadekapeptid (Ia) stellt also mit seiner dem Alamethicin F-50 ähnlichen Konformation mit dominierendem α-Helix-Anteil ein gutes Modell dieses membranmodifizierenden Peptids dar. Der etwas größere α-Helix-Gehalt dürfte keinen großen Einfluß ausüben, da sich hierin auch die verschiedenen natürlichen Spezies Alamethicin , Suzukacillin und Trichotoxin unterscheiden (19).

3.1.2. Konformationsanalyse+

Exakte Aussagen über die Konformation von Peptiden und Proteinen sind nur durch die Röntgenstrukturanalyse von Kristallen möglich. Dennoch führt die Konformationsanalyse aus CD-Daten zu guten Näherungen bei der Konformationsermittlung von Proteinen mit überwiegend geordneter Sekundärstruktur (87,88, 92,101-103). Infolge der Einfachheit und Schnelligkeit der Methode dient sie unter anderem bei der Beobachtung von Konformationsänderungen in biologischen Systemen zu einer nützlichen Abschätzung der Konformationsanteile.
Die Berechnung der Sekundärstruktur von Peptiden und Proteinen mit Hilfe von CD-Messungen beruht auf einem Vergleich der experimentell erhaltenen CD-Spektren

+Herrn Dr. M. Mutter, Tübingen, danke ich vielmals für die Überlassung des Rechenprogramms und die Unterstützung bei der Durchführung der Berechnungen.

mit Referenzspektren von Modellsubstanzen der drei Standardkonformationen α-Helix, antiparallele ß-Konformation und ϱ-Konformation. Der Anteil der drei Standardkonformationen in der Linearkombination

$$[\Theta]_\lambda = \alpha[\Theta]_\alpha + ß[\Theta]_ß + \varrho[\Theta]_\varrho$$

wird bei der "curve-fitting-Methode" variiert, bis der berechnete Kurvenverlauf dem experimentell erhaltenen CD-Spektrum am besten angepaßt ist (104,105). Die Vernachlässigung der von den Standards abweichenden Konformationen wie z.B. ß-Turns (89), 3_{10}Helix (90,91) und die in Proteinen häufig auftretenden gestörten Helices, stellt neben der Auswahl geeigneter Verbindungen mit Standardkonformation das Hauptproblem einer exakten CD-Konformationsanalyse dar.
Greenfield und Fasman (92) wählten Poly-L-Lysin, das bei verschiedenen pH-Werten und nach unterschiedlicher Vorbehandlung in den drei Standardkonformationen vorliegt. Dabei bildet Poly-L-Lysin nach Erhitzen in Wasser bei pH 11 (106,107) eine andere ß-Konformation und somit auch ein anderes CD-Spektrum als Poly-L-Lysin bei pH 7 mit Natriumdodecylsulfat (107,108). Die Autoren wählten die zuerst genannten Bedingungen, weil sie zu einer besseren Approximation führten. Ferner wurde angenommen, das die ungeordnete random-coil-Konformation von Poly-L-Lysin ein gutes Modell für die definierten, nicht periodischen, asymmetrischen Sektionen (ϱ-Konformation) in Proteinen bzw. Peptiden darstellt. Der Vergleich der berechneten Konformationsanteile mit den durch Röntgenstrukturanalyse ermittelten, zeigt von 208-240 nm eine recht gute Übereinstimmung bei einigen Proteinen, die einen großen α-Helix- und ß-Konformationsanteil aufweisen. Dagegen ergeben sich beträchtliche Abweichungen bei Proteinen in vornehmlich ungeordneter ϱ-Konformation. Ebenfalls Poly-L-Lysin als Standard verwandte Myer (109) bei der Entwicklung der isodichroitischen Methode, mit der ohne Computerannäherung des Gesamtspektrums der Konformationsgehalt aus wenigen Punkten des CD-Spektrums ermittelt werden kann.

Man benötigt dazu nur die Elliptizitäten der drei Wellenlängen, bei denen sich jeweils zwei Konformationen schneiden (sog. isodichroitische Punkte). Daraus werden durch Vergleich mit den Elliptizitäten der drei Standardkonformationen bei den isodichroitischen Punkten Konformationsanteile des untersuchten Peptids berechnet. Untersuchungen von Tiffany und Krimm (110-113) führten jedoch zu Zweifeln an der Gültigkeit von Poly-L-Lysin als Modellsubstanz für die ϱ-Konformation. Rosenkranz und Scholtan (87) modifizierten daher die Methode von Greenfield und Fasman (92), indem sie Poly-L-Serin bei hohem Salzgehalt (114) als Standard für die ϱ-Konformation und Poly-L-Lysin mit Natriumdodecylsulfat für die ß-Konformation (108) einsetzten. Besonders bei Proteinen mit beträchtlichem ϱ-Konformationsanteil erzielten sie auch unter 208 nm eine bessere Anpassung an experimentelle CD-Kurven als Greenfield und Fasman. Auf diese neuen Konformationsstandards bezogen sie ebenfalls bei der von Myer (109) entwickelten isodichroitischen Methode und vereinfachten die Anwendung durch Erstellung von Nomogrammen (87); aus diesen kann der Konformationsanteil über die Elliptizitäten der isodichroitischen Punkte direkt abgelesen werden. Eine völlig andere Methode der Standardisierung führten Saxena und Wetlaufer (101) und Chen et al. (102,115) ein, indem sie ihre CD-Referenzspektren aus experimentellen CD-Spektren von verschiedenen Globulärproteinen durch Vergleich mit den Konformationsanteilen aus Röntgenstrukturanalysen berechneten. Die Ermittlung der Elliptizitäten erfolgt aus mindestens drei Gleichungen (für drei verschiedene Proteine) folgenden Typs mit drei Unbekannten

$$[\Theta]_\lambda = \alpha\,[\Theta]_{\alpha,\lambda} + ß\,[\Theta]_{ß,\lambda} + \varrho\,[\Theta]_{\varrho,\lambda}$$

mit $[\Theta]_\lambda$ als experimentell ermittelter mean residue-Elliptizität; α, ß und ϱ sind die Standardkonformationsanteile aus den Röntgenstrukturanalysen. Daraus lassen sich die drei Standardelliptizitäten $[\Theta]_{\alpha,\lambda}$, $[\Theta]_{ß,\lambda}$ und $[\Theta]_{\varrho,\lambda}$ zu jeder gewünschten Wellenlänge berechnen.

Chen et al. (115) erhielten durch Bezug auf fünf Proteine eine bessere Angleichung an die CD-Spektren als Saxena und Wetlaufer (101), besonders wenn der Gehalt an nicht-periodischer ϱ-Konformation die Größenordnung der periodischen Konformation erreicht.
Weitere Referenzspektren wurden von Grosse et al. (116,117) und Schälike et al. (118) durch Anwendung der Matrix-rank-Analyse auf die Referenzspektren von Saxena und Wetlaufer (101) erhalten; Bannister und Bannister (119,120) führten eine ähnliche Modifizierung der Referenzspektren von Chen et al. (102,115) durch.
Chen. et al. berücksichtigten schließlich die bereits früher theoretisch berechnete Abhängigkeit des Circulardichroismus von der Länge der α-Helix (91,121,122) als weiteren Parameter für ihre Konformationsanalysen. Sie fanden für acht Proteine mit α-Helix-Anteil über 20 % und ϱ-Konformationsanteil unter 60 % sehr gute Übereinstimmung mit Röntgenstrukturanalysen. Das Problem der Analyse von Konformationen mit hohen nichtperiodischen Bereichen konnte jedoch auch nicht befriedigt gelöst werden.
Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Peptide weisen meist einen hohen Anteil an geordneter Konformation auf, daher soll trotz der beschriebenen Problematik eine vergleichende CD-Konformationsanalyse nach folgenden Methoden durchgeführt werden.

a) Greenfield und Fasman im Bereich 205-240 nm (92)
b) Rosenkranz und Scholtan nach der isodichroitischen Methode (87)
c) Chen et al. im Bereich 204-243 nm (103)

Die Ergebnisse der Approximation nach der least-square-Methode für a) und c) bzw. durch Nomogramm-Auswertung für b) sind in Tab. 3.2 aufgeführt. Es zeigt sich, daß die Ermittlung des α-Helixanteils nach den drei Verfahren relativ gute Übereinstimmung ergibt. Die Werte für die ß-Konformation weichen dagegen stark voneinander ab. Dies wird bei Betrachtung der ähnlichen α-Helix-Standardspektren verständlich, während die ß-Konformationsstandardspektren doch erhebliche Unterschiede aufweisen (88).

Die größere Fehlerbehaftung der isodichroitischen Methode, besonders für die ß- und ϱ-Konformation, ergibt sich durch die Lage der isodichroitischen Punkte in Wellenlängenbereichen mit großen Steigungen der CD-Kurven. Die Gesamtkonformation kann außerdem von 100 % abweichen, da die Konformationsanteile unabhängig voneinander bei verschiedenen Wellenlängen ermittelt werden.
Übereinstimmend ergibt sich jedoch aus allen Berechnungen, daß bei den N-geschützten und N-protonierten Oligomeren am polymeren Träger die kleinen Spezies einen ß-Turn ausbilden, der mit zunehmender Peptidlänge immer mehr abnimmt. Für das N-geschützte Octapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_4$-OPOE wird durch Berechnungen erstmals ein geringer α-Helixanteil erhalten, der mit zunehmender Kettenlänge bis zum Tetradekapeptid auf ca. 40 % ansteigt. Der Helixgehalt der N-protonierten Oligomere liegt stets um ca. 10 % niedriger als bei N-geschützten Oligomeren gleicher Länge, während der α-Helixgehalt der durch Abspaltung erhaltenen Hydrazide um die gleiche Größenordnung höher liegt.
Aufschlußreich ist ein Vergleich des α-Helixgehaltes der N-geschützten Oligomere mit dem synthetisierten Nonadekapeptid (Ia) bzw. Hexadekapeptid (II) und dem natürlichen Nonadekapeptidantibiotikum AlamethicinF-50 (Abb. 3.8) Für das Nonadekapeptid (Ia) berechnet man einen mittleren α-Helixanteil von 44 %, der etwas über dem des Tetradekapeptids BOC-(Aib-L-Ala)$_7$-OPOE liegt. Alamethicin F-50 mit 35 % α-Helix ist vergleichbar mit dem Dodekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_6$-OPOE, und das Hexadekapeptid (II) erreicht einen mittleren Helixgehalt von 24 %, der auch beim Dekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OPOE gefunden wird. Daraus zeigt sich, daß das durch Kondensation von BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH mit H-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe dargestellte Hexadekapeptid (II) mit dem backbone-verändernden Prolin an der Verknüpfungsstelle keinen höheren α-Helixanteil aufweist, als das N-terminale Dekapeptid selbst. Das Einfügen des Tripeptids Gly-L-Ala-Aib in Nonadekapeptid (Ia)

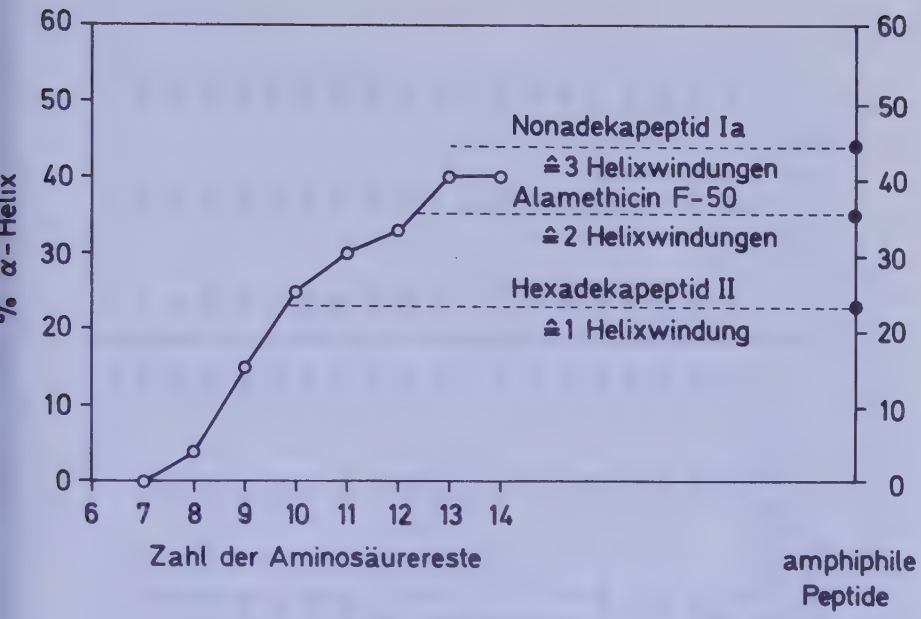


Abb. 3.8 α-Helixgehalt in Abhängigkeit der Peptidlänge von BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE (n = 3-7) und Vergleich mit den Helix-Anteilen der amphiphilen Peptide

führt dagegen zu einem deutlich größeren α-Helixgehalt, der den des Tetradekapeptidmodells sogar noch übersteigt. Berücksichtigt man schließlich bei den berechneten α-Helixanteilen der amphiphilen Peptide noch die Kettenlänge, so ergeben sich im Nonadekapeptid (Ia) drei α-Helixwindungen, in Alamethicin F-50 zwei und für das Hexadekapeptid (II) nur eine α-Helixwindung. Eine endgültige Klärung der Konformation wird allerdings erst eine geplante Röntgenstrukturanalyse des kristallinen Dekapeptidderivates BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-O$^-$Cs$^+$ (Abb. 2.7,d) erbringen können.

Tab. 3.2 Konformationsberechnungen aus CD-Spektren mit Hilfe unterschiedlicher Konformationsstandards

Verbindung	Greenfield und Fasman (92)			Rosenkranz und Scholtan (87)			Chen et al. (103)		
	%α	%ß	%ϙ	%α	%ß	%ϙ	%α	%ß	%ϙ
Nonadekapeptid Ia	42	4	54	45	0	56	45	0	55
Hexadekapeptid II	23	18	59	16	3	67	31	4	65
Alamethicin F-50	32	19	49	30	0	69	42	0	58
BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OMe	27	8	65	28	0	64	29	5	66
BOC-Gly-L-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe	2	27	71	0	3	64	6	16	78
BOC-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe	0	34	66	0	6	93	0	20	80
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OMe	0	44	56	0	50	52	0	29	71
BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OMe	0	24	76	0	0	100	0	19	81
BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OH	0	28	72	0	0	100	0	19	80
BOC-(Aib-L-Ala)$_7$-OPOE	42	2	56	38	0	68	41	0	59
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_6$-OPOE	42	2	56	38	0	57	41	0	59
BOC-(Aib-L-Ala)$_6$-OPOE	35	3	62	31	0	80	34	0	66
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_5$-OPOE	31	8	61	26	0	80	32	0	68
BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OPOE	24	9	67	16	0	98	26	2	72
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-OPOE	15	15	70	12	0	84	17	7	76
BOC-(Aib-L-Ala)$_4$-OPOE	5	20	75	0	0	100	6	13	81
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-OPOE	0	31	69	0	1	89	2	18	80

Tab. 3.2 Fortsetzung

BOC-(Aib-L-Ala)$_3$-OPOE	0	29	71	0	0	100	0	22	78
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OPOE	0	43	57	0	52	53	0	26	74
BOC-(Aib-L-Ala)$_2$-OPOE	0	36	64	0	21	92	0	23	77
BOC-L-Ala-Aib-Ala-OPOE	0	58	42	0	100	0	0	42	58
H-(Aib-L-Ala)$_7$-OPOE	35	7	58	29	0	56	35	0	65
H-L-Ala-(Aib-Ala)$_6$-OPOE	32	9	59	26	2	63	34	0	66
H-(Aib-L-Ala)$_6$-OPOE	26	14	60	21	0	72	30	0	70
H-L-Ala-(Aib-Ala)$_5$-OPOE	18	17	65	13	0	78	24	3	73
H-(Aib-L-Ala)$_5$-OPOE	15	17	68	9	0	93	21	1	78
H-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-OPOE	1	32	67	0	8	76	9	16	75
H-(Aib-L-Ala)$_4$-OPOE	0	37	63	0	21	78	0	23	77
H-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-OPOE	0	43	57	0	44	58	0	28	72
H-(Aib-L-Ala)$_3$-OPOE	0	48	52	0	74	39	0	31	69
H-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OPOE	0	49	51	0	76	34	0	35	65
H-(Aib-L-Ala)$_2$-OPOE	0	50	50	0	98	20	0	38	62
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-NH-NH$_2$	-	-	-	28	0	70	28	0	72
BOC-(Aib-L-Ala)$_4$-NH-NH$_2$	-	-	-	7	0	100	14	10	76
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-NH-NH$_2$	-	-	-	2	0	85	14	14	72

3.2. FT-FIR-Spektroskopie[+]

Die IR-Spektroskopie stellt eine wichtige Methode zur Konformationsuntersuchung von Makromolekülen dar. Bei Peptiden wird die Lage der Amid-Absorptionsfrequenzen von Valenz- bzw. Deformationsschwingungen zur Konformationsanalyse herangezogen (123-126). Die Absorptionen im fernen Infrarotbereich (FIR) werden bei Peptiden jedoch nur selten gemessen (127,128), obwohl die in diesem Bereich auftretenden Gerüstdeformations- und inneren Rotationsschwingungen stark von den inneren Rotationswinkeln und damit von der Konformation abhängen. Die Frequenzverschiebungen im FIR lassen sich somit ebenfalls zur Konformationsanalyse heranziehen.
In Abb. 3.9 werden die FIR-Spektren der N-geschützten Peptidpolymerester BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE vom Tri- bis Dodekapeptid gezeigt. Die Polyoxyethylen-Gruppe mit drei starken Absorptionen bei 216, 165 und 107 cm^{-1} stört die Aufnahme der Peptid-Absorptionen zwischen 250 und 450 cm^{-1} nicht. Das günstige Schmelzverhalten der POE-Estergruppe läßt sich jedoch zur Anfertigung von Peptid-Polymer-Presslingen heranziehen, die direkt gemessen werden können.
Das FIR-Spektrum des Tripeptids BOC-L-Ala-Aib-Ala-OPOE weist zwei breite Banden bei 327 bzw. 359 cm^{-1}auf; diese sind beim Tetrapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_2$-OPOE schärfer und jeweils um 10 cm^{-1} kurzwellig verschoben. Beim Pentapeptid BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OPOE zeichnet sich bereits eine Änderung der Spektrenform ab, und ab dem Heptapeptid BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-OPOE treten bei 329 cm^{-1} und 378 cm^{-1} schwache Absorptionen auf, die für die α-Helix-Konformation charakteristisch sind. Diese Banden wurden bei Messungen von α-helikaler Poly-γ-Methyl-L-glutaminsäure bei 336 cm^{-1} bzw. 410 cm^{-1} und von Poly-L-Alanin bei 375 cm^{-1} beobachtet (129). Die Intensitäten dieser beiden Absorptionen sind in Abb. 3.10 in Abhängigkeit der Peptidlänge dargestellt. Man sieht, daß die Intensität der Extinktion bei 330 cm^{-1} mit steigendem α-Helix-Gehalt weniger stark zunimmt als die

[+]Herrn Prof. Dr. V. Hoffmann, Tübingen, danke ich vielmals für die Aufnahme der Spektren.

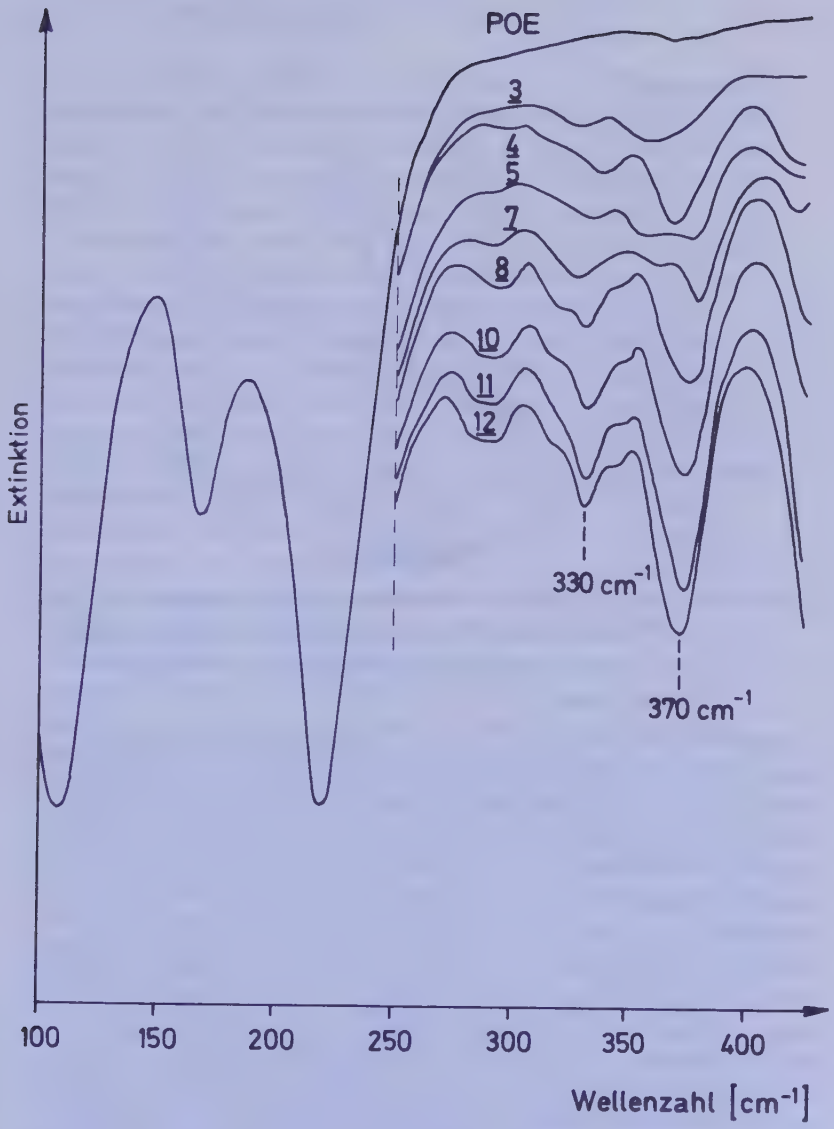


Abb. 3.9 FIR-Spektren der N-geschützten Tri- bis Dodekapeptid-Polymerester BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE (n = 2-6) und BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_m$-OPOE (m = 1-5)

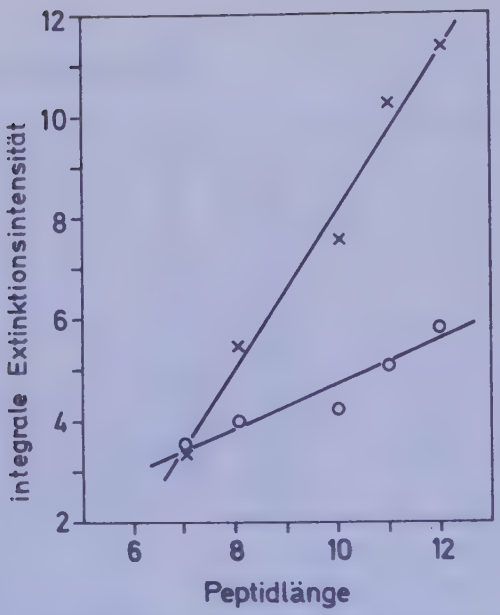


Abb. 3.10 Abhängigkeit der FIR-Extinktionsintensität bei 330 cm^{-1} und 370 cm^{-1} von der Länge der N-geschützten Tri- bis Dodekapeptid-Polymerester BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE

Intensität der Bande bei 370 cm^{-1}. Dies wird verständlich, wenn man die Schwingungen nach Krimm et al. (156) zuordnet. Danach wird die Absorption im Bereich 370 cm^{-1} hauptsächlich durch CO-in plane-bending, gekoppelt mit NH- out of plane-bending hervorgerufen und ist somit stärker von einer Helix-zunahme abhängig, als die Absorption bei 330 cm^{-1}, die größtenteils einem C_β-bending zugeordnet werden kann. Bei ersterer verschiebt sich zudem die Absorptionsfrequenz von 378 cm^{-1} beim Heptapeptid nach 370 cm^{-1} beim Dodekapeptid. Abschließend läßt sich sagen, daß die FIR-Spektren die aus den CD-Spektren abgeleiteten Konformationsaussagen bestätigen. So weisen die breiten, flachen Absorptionsbanden beim Tripeptid auf einen ß-Turn hin (129). Zudem fällt das Auftreten der beiden für die α-Helix charakteristischen Banden bei 330 cm^{-1} bzw. 370 cm^{-1} beim Heptapeptid BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-OPOE zusammen mit dem erstmaligen Auftreten des "exciton splitting" im CD-Spektrum.

3.3. ^{13}C-NMR-Spektroskopie

Die ^{13}C-NMR-Spektroskopie wurde bereits bei der Strukturaufklärung der membranmodifizierenden Peptidantibiotika Alamethicin (10,13,22), Suzukacillin (29,73) und Trichotoxin (6,19,38) erfolgreich eingesetzt. Dabei zeigte sich, daß die Signallagen für einige Aminosäure-C-Atome bis zu 5 ppm gegenüber ihrer Lage in kleinen Peptiden verschoben sind. Da die Verschiebungen auf eine unterschiedliche Abschirmung durch Nachbargruppen zurückzuführen sind, können daraus auch Aussagen über die Konformation abgeleitet werden. So wurden u.a. die Helix-Coil-Übergänge von Poly-L-Glutaminsäure (130) und Poly-L-Glutaminsäure-γ-benzylester bzw. Poly-L-Asparaginsäure-ß-benzylester (131) ^{13}C-NMR-spektroskopisch untersucht. Übereinstimmend fand man Hochfeldverschiebungen der C_α und CO-Signale um 2-3 ppm und Tieffeldverschiebungen der $C_ß$-Signale um ca. 1 ppm. Die Unsicherheit lag bei diesen Methoden nur in der Lösungsmitteländerung die zum Konformationswechsel führte. Durch die Synthese von BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe ergab sich die Möglichkeit, neben dem ^{13}C-NMR-Spektrum dieses Nonadekapeptids auch die Spektren seiner Fragmente im gleichen Lösungsmittel aufzunehmen. Dies erleichterte die Zuordnung der Signale erheblich, da die chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit der zunehmenden Fragmentlänge bis zum Nonadekapeptid (Ia) verfolgt werden konnten. Zur Ermittlung der chemischen Verschiebungen von Alanin und α-Aminoisobuttersäure konnten zudem die durch ^{13}C $\{^{13}$C-^{1}H$\}$-Tripelresonanz-Technik erhaltenen Spektren der mit Polyoxyethylen (POE) veresterten Oligopeptide BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE und H-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE herangezogen werden (53). Da Alanin und α-Aminoisobuttersäure sowohl in den natürlichen Peptidantibiotika als auch im synthetisierten Modellpeptid in helikaler und nicht helikaler Umgebung vorkommen, sind die Signallagen dieser beiden Aminosäuren besonders geeignet zur Festlegung von Konformationsanteilen im Gesamtpeptid.

3.3.1. ^{13}C $\{^{13}C-^{1}H\}$ Tripel-Resonanz-Spektren[+] von polymergebundenen Peptiden

Während der stufenweisen Synthese von polyoxyethylenveresterten Peptiden der allgemeinen Formel BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE erhält man mit jeder Verlängerung der Peptidkette eine geringe Änderung der Konformation. Mit den ^{13}C-Daten dieser Peptide erhält man somit die chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren-C-Atome in unterschiedlicher chemischer Umgebung. Bei der Aufnahme der ^{13}C-Spektren tritt jedoch das Problem auf, daß Polyoxyethylen neben den Endgruppensignalen ein sehr intensives CH_2-Signal zeigt. Dieses Signal ist bei Molmassen über 1000 g/mol so stark, daß die schwachen Signale der Peptidkette mit den üblichen Techniken nur in extrem geringen Intensitäten beobachtet werden können. Daher muß man versuchen, das Polymersiganl zu unterdrücken, da dieses Signal den dynamischen Bereich der gewöhnlich benutzten Computer übersteigt. Dies kann mittels zwei Techniken durchgeführt werden, wobei die selektive Sättigung der POE-Resonanz (53) einer selektiven Nichtanregung des Signals (132) vorgezogen wurde. Da die inneren Methylen-C-Atome von POE bei 71,5 ppm absorbieren, stört der Ausfall eines Bereichs von 20 - 25 Hz (ca. 1 ppm) bei Peptidspektren nicht. Kommerzielle Geräte sind gewöhnlich nicht für $^{13}C-^{13}C$-Doppelresonanz ausgerüstet; eine Beschreibung des Spektrometers wird in (53) gegeben. Die ^{13}C-NMR-Spektren der N-geschützten polymergebundenen Peptide BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE werden in Abb. 3.11 gezeigt, die Spektren der N-protonierten Peptide H-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE in Abb. 3.12.
Vergleicht man die chemischen Verschiebungen der Peptid-Polymer-Ester (Tab. 3.3) im Vergleich zu den CD-Konformationsanteilen (berechnet nach Chen et al.) (102,103), so weisen bei den N-geschützten Peptiden die drei charakteristischen Signale der tert-Butyloxycarbonylgruppe stets dieselben chemische Verschiebung auf.

[+]Herrn Prof. Dr. D. Leibfritz, Bremen, danke ich vielmals für die Aufnahme der Spektren.

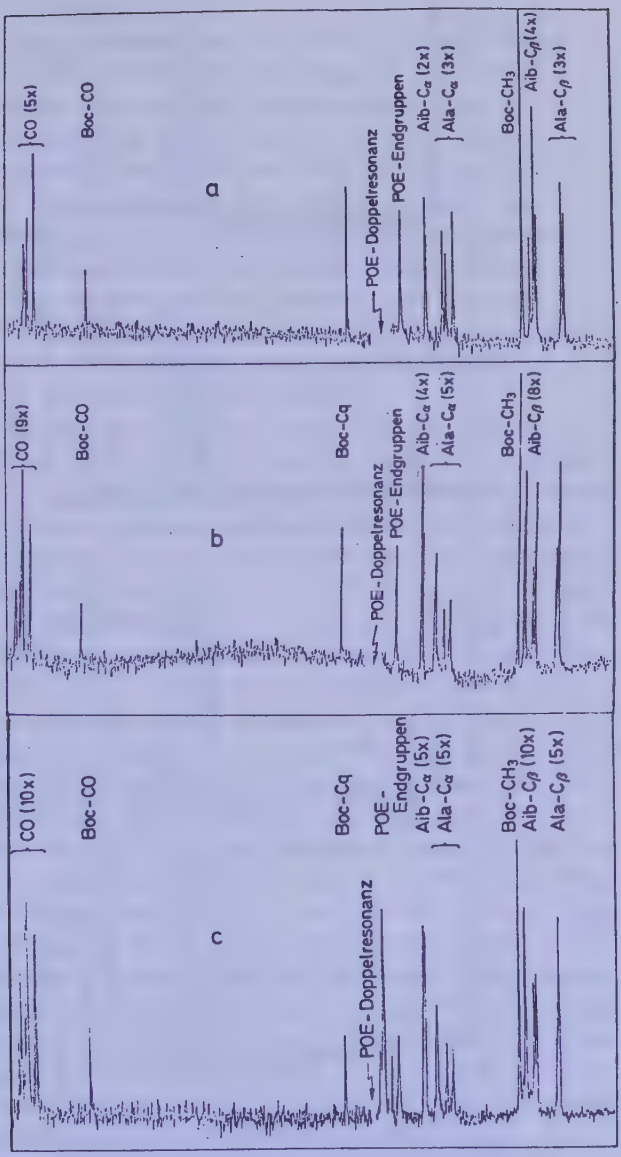


Abb. 3.11 ^{13}C $\{^{13}C-^{1}H\}$ -NMR-Spektren von BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OPOE (a), BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-OPOE (b) und BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OPOE (c) in $^{12}C^{2}H_3O^{2}H$ (T = 303°K, c = 1 mg/ml).

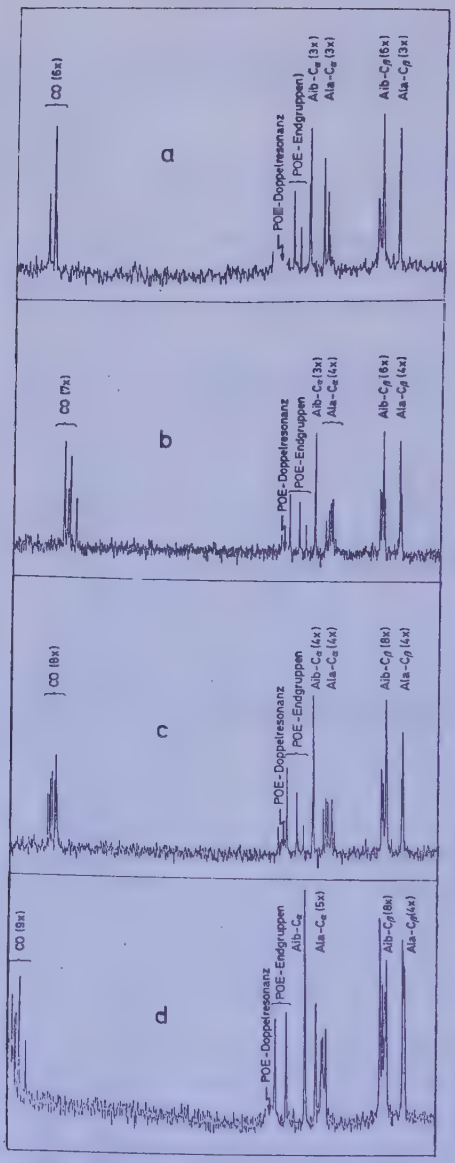


Abb. 3.12 $^{13}C\{^{13}C\text{-}^{1}H\}$ -NMR-Spektren von H-(Aib-L-Ala)$_3$-OPOE (a), H-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-OPOE (b), H-(Aib-L-Ala)$_4$-OPOE (c) und H-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-OPOE (d) in $^{12}C^{2}H_3O^{2}H$ (T = 303°K, c = 1 mg/ml).

Auch die Aib-C_α-Signale und die Ala-C_β-Signale werden nur relativ schwach beeinflußt. Dagegen zeigen die Ala-C_α-Atome in α-helikaler Umgebung eine deutliche Tieffeldverschiebung und die Aib-C_β spalten durch elektrische Feldeffekte des Helixdipols in zwei Signalgruppen auf. Leider kann die Empfindlichkeit der Carbonylresonanzen gegenüber Konformationsänderungen aufgrund noch bestehender Zuordnungsschwierigkeiten nicht voll ausgenutzt werden. Dennoch läßt sich mit zunehmender Helixausbildung bis zum Dekapeptid eine Verschiebung des gesamten Carbonyl-Signal-Bereiches zu tiefem Feld bis 178,8 ppm beobachten.
Im Falle des Pentapeptids BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_2$-OPOE (Abb. 3.11,a) differieren die Aib-C_β-Signale um 1,8 ppm und die vier Signale sind über den gesamten Aufspaltungsbereich verteilt. Dagegen erfolgt bei den bereits über einen signifikanten α-Helixanteil verfügenden Peptid-Polymer-Estern BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_5$-OPOE (Abb. 3.11,b) und BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-OPOE (Abb. 3.11,c) eine Aufspaltung der Aib-C_β-Signale um 3,5 ppm bzw. 3,2 ppm. Die Aufspaltung in Alamethicin liegt bei 3,5 ppm (10) und weist ebenso wie die oben beschriebenen helikalen Peptide je eine C_β-Signalgruppe bei hohem und tiefem Feld auf. Dieselbe Übereinstimmung wird auch zwischen den Ala-C_α-Signalen der obigen Nona- bzw. Dekapeptide mit 53,5 ppm bzw. 53,8 ppm und Alamethicin mit 53,4 ppm gefunden. Diese Tieffeldlage ist charakteristisch für Alanin in α-helikaler Umgebung und unterscheidet sich um 2 - 3 ppm von den Verschiebungen der ♀-Konformation mit 50,9 ppm im Nonapeptid bzw. 51,0 ppm im Dekapeptid. Das hochfeldverschobene Ala-C_α-Signal der N-geschützten Peptide zwischen 49 und 50 ppm ist normal und entspricht den üblichen Verschiebungen bei C-terminalem Alanin mit Esterschutzgruppen. Der N-protonierte Nonapeptidester H-L-Ala-$(Aib-Ala)_4$-OPOE zeigt im CD-Spektrum ebenfalls eine gewisse Tendenz zur α-Helixbildung, die mit dem intensiven Signal bei 53,3 ppm in Einklang steht. Jedoch ist die Interpretation der Spektren von protonierten

Tab. 3.3 ^{13}C-NMR chemische Verschiebungen^{+} verschiedener $(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_n$-Polyoxyethylen-Ester und von BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_4$-NH-$NH_2$ im Vergleich zu Konformationsanteilen aus CD-Spektren

Verbindung	Ala		Aib		Δδ (ppm)	CO-Signale		BOC	Konformation		
	Cα	Cß	Cα	Cß					%α	%ß	%ρ
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OPOE	52,7	17,7	57,9(2)	26,9		176,9	176,6	158,2CO			
	51,8	17,5	57,6	25,6(2)	1,8	175,6	173,9(2)	80,9Cq	0	26	74
	49,7	16,9		25,1				29,1CH_3			
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-OPOE	53,5(3)	18,0	57,8(2)	27,3(2)		178,3	178,1	158,6			
	50,9	17,6	57,3(2)	27,1(2)	3,5	177,0	176,4(3)	81,3	17	7	76
	49,2	17,2(3)		24,7		175,9	173,9(2)	29,0			
				23,8(3)							
BOC-(Aib-L-Ala)-OPOE	53,8(3)	17,7	57,9(3)	27,0(6)		178,8	178,4	158,0			
	51,0	17,5	57,6(2)	24,6(2)	3,2	176,5(5)	174,0(3)	81,2	26	2	72
	49,3	16,9(3)		23,8(2)				29,0			
BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_4$-NH-$NH_2$	49,2	17,0	57,3	23,5		176,5(3)	177,1	157,8			
	53,5	17,3(3)	57,5	23,7	4,2	177,5	178,5(2)	81,2	28	0	72
	53,6		57,7	24,0		179,4		28,9			
	54,0		58,0	24,4							
				26,7							
				26,8							
				27,1							
				27,7							

Tab. 3.3 Fortsetzung

H-(Aib-L-Ala)$_3$-OPOE	51,2 49,5 48,8	17,1 16,7(2)	57,9 57,5(2)	26,4 26,0 24,2(3) 23,8	2,6	176,4 173,1	173,8(3)		0	31	69
H-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-OPOE	52,7 51,3 50,5 49,9	17,7(2) 17,1 16,8	58,0 57,8(2)	26,8 26,0 25,5 25,3(2) 24,7	2,1	177,0(2) 175,1(2) 171,0	176,6 174,0		0	28	72
H-(Aib-L-Ala)$_4$-OPOE	52,8 51,6 50,8 49,2	17,5 16,8(3)	57,9 57,5(2) 57,3	26,5 26,3 25,5 24,4(2) 24,0(3)	2,5	177,5 176,3 174,3 173,2	176,8 175,5 173,8(2)		0	23	77
H-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-OPOE	53,3(2) 51,0 50,5 49,4	17,7(3) 17,5(2) 16,9	57,8(4)	26,8(3) 25,9 24,7 24,5 24,1(2)	2,7	178,2 176,6 175,4 171,2	177,2(2) 176,0 173,9(2)		9	16	75

+in $^{12}C,^{2}H$-Methanol relativ zu internem Tetramethylsilan (δ = 0 ppm); relative Intensitäten werden in Klammern angegeben.

Oligopeptiden schwieriger, da die positive Ladung Signal-Verschiebungen bei den N-terminalen Aminosäuren verursacht. Dennoch erkennt man neben der Tendenz der zunehmenden Tieffeldverschiebung der Ala-C_α-Signale bei der Ausbildung eines α-Helixkonformationsanteils vor allem bei den Aib-C_β-Signalen gewisse Gesetzmäßigkeiten. So liegen die Aib-C_β-Signale bei Peptiden mit N-terminaler α-Aminoisobuttersäure stets bei höherem Feld als bei Peptiden mit N-terminalem Alanin. Dies steht in Einklang mit dem größeren Einfluß der positiven Ladung, wenn α-Aminoisobuttersäure N-terminal steht. Daneben zeigt sich beim Nonapeptid, daß trotz einer Aib-C_β-Signalaufspaltung um 2,7 ppm keine Signalgruppen auftreten, sondern daß auch im Zwischenbereich bei 25,9 und 24,7 ppm Signale auftreten, wie sie auch in kleinen Aib-Peptiden beobachtet werden.
Abschließend sei das in Abb. 3.13 gezeigte ^{13}C-NMR-Spektrum des geschützten Octapeptidhydrazids BOC-(Aib-L-Ala)$_4$-NH-NH_2 diskutiert. Dieses Peptid wurde durch Hydrazinolyse des entsprechenden Peptid-Polymer-Esters dargestellt und zusammen mit den analog erhaltenen Hepta- und Nonapeptidhydraziden CD-spektroskopisch untersucht. Die Peptidhydrazide zeigen dabei jeweils einen höheren α-Helixgehalt als die entsprechenden Peptid-Polymer-Ester. Diese Ergebnisse werden nun durch die ^{13}C-NMR-Spektroskopie erhärtet. Man erhält eine Ala-C_α-Signalgruppe bei 54,0; 53,6 und 53,5 ppm, die auf eine helikale Umgebung schließen läßt. Das Zentrum der Signalgruppe ist gegenüber demjenigen des Nonapeptid-Polymer-Esters mit einem Signal dreifacher Intensität bei 53,5 ppm nach tieferem Feld verschoben. Noch deutlicher wird die Zunahme des α-Helixgehaltes beim Betrachten der Aib-C_β-Signale. Es kommt beim Octapeptidhydrazid zur Ausbildung zweier Signalgruppen durch magnetische Nichtäquivalenz der ß-CH_3-Gruppen, die mit 4,2 ppm größer ist als im Nonapeptid-Polymer-Ester mit 3,5 ppm.

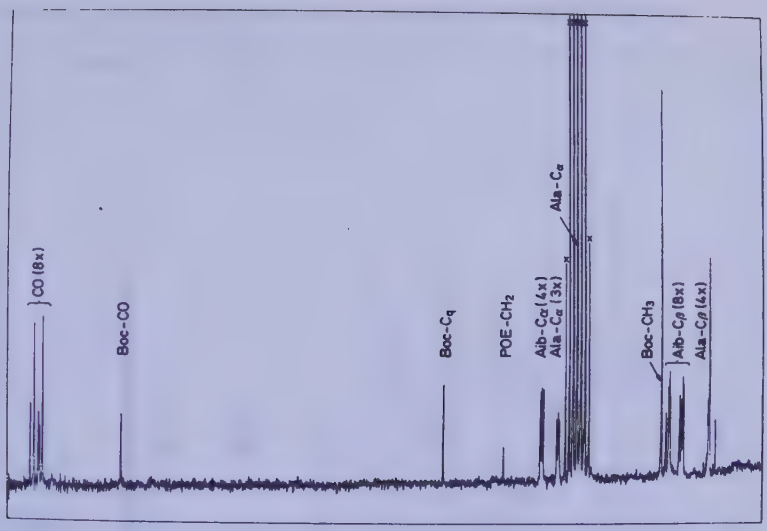


Abb. 3.13 ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-(Aib-L-Ala)$_4$-NH-NH$_2$

3.3.2. ^{13}C-NMR-Spektren[+] von BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe und einer Auswahl der zur Synthese benutzten Peptidfragmente

Das ^{13}C-NMR-Spektrum des geschützten Tripeptids BOC-Gly-L-Ala-Aib-OMe in Abb. 3.14 weist mit Ala-C_β = 18,3 ppm, Aib-C_β =25,2 ppm, Gly-C_α = 44,8 ppm, Ala-C_α =57,1 ppm Signallagen auf, wie sie bei einer Vielzahl kleinerer Aib- und Ala-Peptide (10) beobachtet werden. Die beiden Aib-C_β-Signale liegen frequenzgleich; diese Äquivalenz ist bei der Nachbarschaft des asymmetrischen Ala-C_α nur durch eine freie Drehbarkeit um die Aib-N-C_α-Bindung möglich. Bei Ausbildung einer etwa über Wasserstoffbrücken stabilisierten Konformation wäre diese Drehbarkeit eingeschränkt und die diastereotopen Aib-C_β würden sich in der ^{13}C-Kernresonanz unterscheiden.

[+]Herrn G. Bovermann und Frau Gerlach danke ich vielmals für die Aufnahme der Spektren.

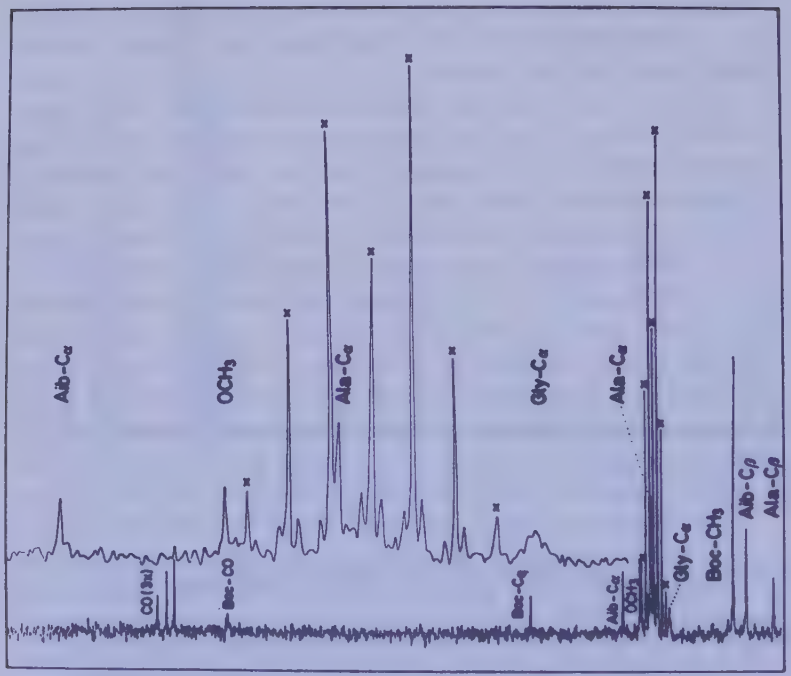


Abb. 3.14 ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Gly-L-Ala-Aib-OMe in $C^2H_3O^2H$(x)

Abb. 3.15 zeigt das Spektrum von BOC-L-Pro-Ala-Aib-OMe, bei dem die beiden Methylgruppensignale von Aib ebenfalls frequenzgleich bei 25,3 ppm liegen; das Pro-C_γ-Signal bei 24,6 ppm konnte durch off-resonance-Messung vom Aib-C_β-Signal bei 25,3 ppm unterschieden werden. Dagegen verursacht Prolin mit seinem starren Pyrrolidin-Gerüst und der N-terminalen Amidverknüpfung mit partiellem Doppelbindungscharakter eine Signalaufspaltung. Durch die Z- bzw. E-Isomerie des folgenden Restes bezüglich dem Pro-C_α-Atom liegen die Prolin-C-Atome und

BOC-CO in unterschiedlicher Umgebung vor, die Signale spalten auf (133-135).

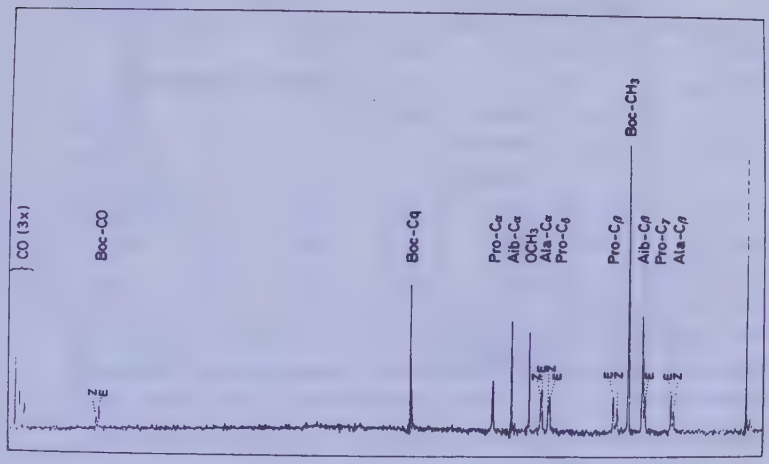


Abb. 3.15 ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-L-Pro-Ala-Aib-OMe in $^{12}C,^{2}H$-Methanol.

Auch die Signale des auf Prolin folgenden Alanin spalten noch auf, trotz der Rotationsmöglichkeiten um Pro-C_α-CO und um Ala-NH-C_α. Am Modell konnte gezeigt werden, daß die C-Atome von Alanin bei Z- bzw. E-Konformation in unterschiedlicher chemischer Umgebung vorliegen. In Tab. 3.4 sind die chemischen Verschiebungen der Z- bzw. E-Signale und ihre Intensitäten aufgezeigt.

Tab. 3.4 Chemische Verschiebungen und Intensitäten von BOC-L-Pro-Ala-Aib-OMe-Signalen mit Z/E-Isomerie

Zuordnung	E δ(ppm)	Z δ (ppm)	Δppm	Intensität E (%)	Intensität Z (%)
BOC CO	155,8	156,4	0,6	67	33
Pro C_α	61,3		0	keine Aufspaltung	
C_β	32,3	31,4	0,9	57	43
C_γ	24,6	verdeckt d.Aib-C_β	-	-	-
C_δ	47,8	48,2	0,4	57	43
Ala C_α	49,7	49,9	0,2	54	46
C_β	18,3	17,6	0,7	61,5	38,5

Man erkennt in Tab. 3.4, daß im vorliegenden Peptid die E-Form mit durchschnittlich 60 % gegenüber der Z-Form begünstigt ist. Die freie Enthalpie ΔG° des E/Z-Gleichgewichts läßt sich nach folgender Gleichung berechnen.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K; \quad K = \frac{[E]}{[Z]}$$

Bei 30°C ergibt sich danach eine Differenz der freien Enthalpie ΔG° = -1,0 KJ/mol.

Im Gegensatz zu den beiden besprochenen Peptiden findet man bei BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe in Abb. 3.16 eine Aufspaltung der Aib-C_β-Signale um 0,2 ppm. Dazu muß neben der unterschiedlichen chemischen Umgebung der beiden Aib-C_β noch eine Einschränkung der freien Drehbarkeit um Aib-NH-C_α vorliegen. Im CD-Spektrum (Abb. 3.1) wurden für dieses Tripeptid bereits Hinweise auf einen ß-Turn gefunden. Die Wasserstoffbrückenbindung in einem derartigen ß-Turn könnte auch die Rotationsbehinderung erklären. Ferner fällt im ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe die starke Tieffeldverschiebung des N-terminalen Ala-C_α mit 51,9 ppm auf, gegenüber dem vergleichbaren Ala-C_α von BOC-L-Ala-Aib-OBu^t mit 50,7 ppm (41). Diese Verschiebung liegt beim C-terminalen Alanin nicht vor; das C_α-Signal liegt hier mit 49,7 ppm im gleichen Bereich wie in Z-Aib-L-Ala-OMe

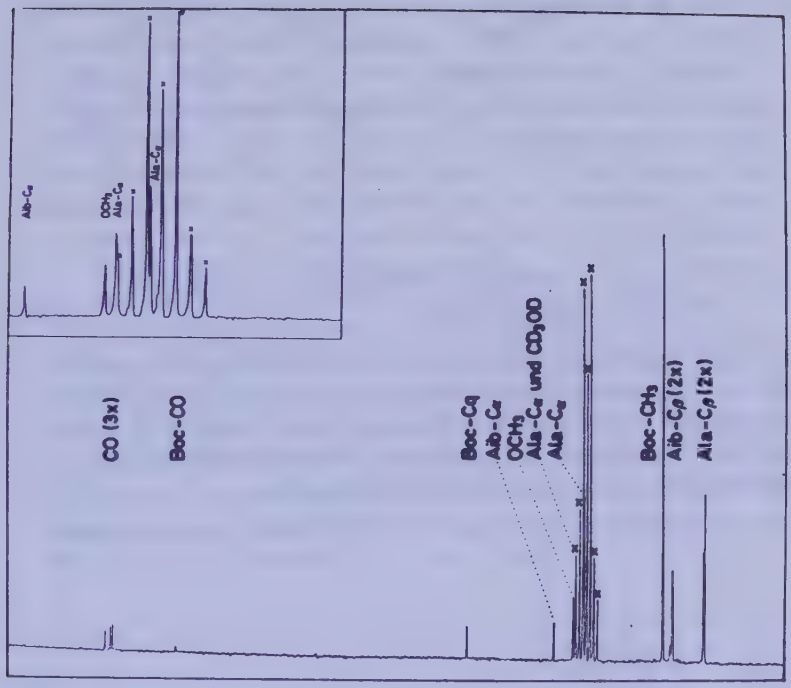
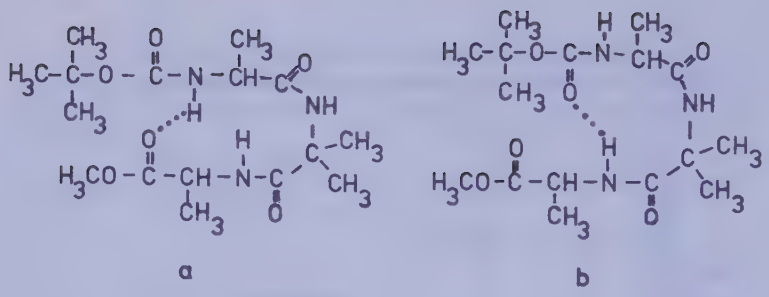


Abb. 3.16 ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe in ^{2}H-Methanol (x)

mit 49,5 ppm (41). Berücksichtigt man diese Befunde hinsichtlich der möglichen Wasserstoffbrückenbindungen im ß-Turn (Abb. 3.17), so sollten bei einer Bindung nach (a) beide Ala-C_α im ß-Turn-Backbone liegen. Durch Erhöhung der Nachbargruppeneinflüsse müßten somit auch beide C_α tieffeldverschoben sein. Da dies nicht der Fall ist, ist eine Wasserstoffbrückenbindung nach (b) anzunehmen, bei der nur das N-terminale Ala-C_α im ß-Turn und somit tieffeldverschoben liegt.



a b

Abb. 3.17 Mögliche Wasserstoffbrücken in ß-Turns von BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe

Im ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe (Abb. 3.18) treten vier Aib-C_β-Signale bei 26,1, 25,5, 25,3 und 25,1 ppm auf. Gegenüber den Tripeptiden in Abb. 3.14 und 3.15 weist hier das C-terminale Aib erstmals eine unterschiedliche Umgebung für die beiden Methylgruppen auf.

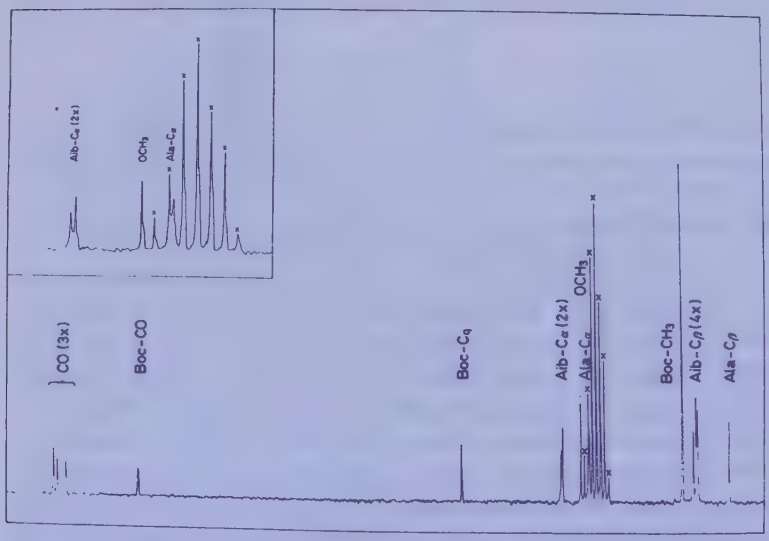


Abb. 3.18 ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe in ^{2}H-Methanol (x)

Die Einschränkung der Rotationsfreiheitsgrade für das C-terminale Aib ließe sich ebenfalls durch die Ausbildung eines ß-Turns erklären, wie er bereits bei BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe (Abb. 3.16) beobachtet wird. Dagegen spricht allerdings neben dem CD-Spektrum (Tab. 3.1) ohne signifikanten Cotton-Effekt des ß-Turns auch die geringe Tiefeldverschiebung von Ala-C_α nach 50,6 ppm, während das Signal in BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe für das N-terminale Ala-C_α im ß-Turn nach 51,9 ppm verschoben ist. Es liegt demnach eher eine fixierte φ-Konformation vor.
Für das C-terminale Ende des Nonadekapeptids wird das ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Abb. 3.19) zur Unterscheidung von Glutamin- und Glutaminsäuresignalen herangezogen. Bei Glutaminsäure ist das C_α-Signal (54,2 ppm) verglichen mit Glutamin (53,3 ppm) um 0,9 ppm nach tieferem Feld verschoben, während die C_β- und C_γ-Signale von Glutaminsäure jeweils bei höherem Feld liegen als bei Glutamin; der Frequenzunterschied beträgt für C_β 0,4 ppm und für C_γ 1,1 ppm (136).

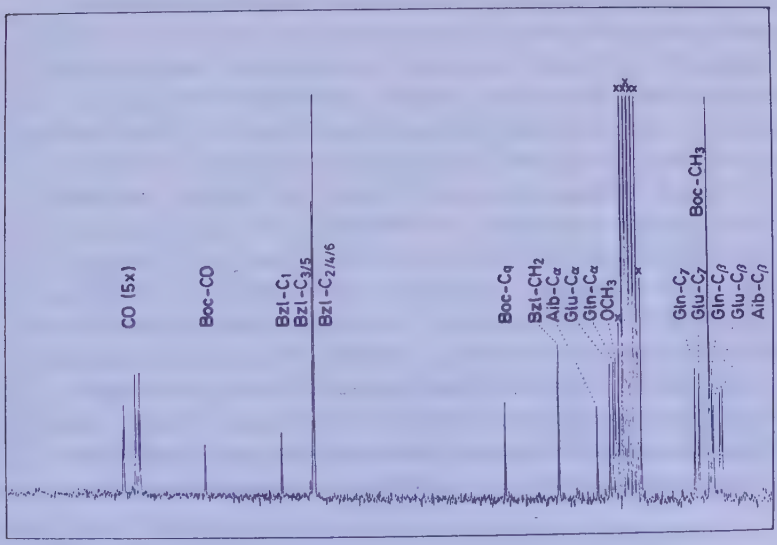


Abb. 3.19 ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe in ^{2}H-Methanol (x)

Die Aromatensignale der γ-Benzylestergruppierung findet man bei C_1 = 135,5 ppm, $C_{3/5}$ = 129,5 ppm und $C_{2/4/6}$ = 129,1 ppm (10). Die Integrale der Signale $C_{3/5}$ verhalten sich mit 764,5 und 1174,6 wie 2 zu 3. Die Aufspaltung der beiden Methylgruppensignale des N-terminalen Aib bei 26,1 ppm und 25,3 ppm fällt mit 0,8 ppm gegenüber 0,2 ppm bei BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe (Abb. 3.16) schon recht deutlich aus. Daraus läßt sich schließen, daß die Auswirkung der diastereotopen chemischen Umgebung auf die beiden Aib-C_β-Atome in BOC-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe ausgeprägter ist.

In den Spektren der beiden Pentapeptide BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OMe (Abb. 3.20) und BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OMe (Abb. 3.21 erkennt man jeweils 5 Carbonylsignale von Aminosäuren und etwas nach hohem Feld abgesetzt zwischen 157 und 158 ppm jeweils das Carbonylsignal der Urethanschutzgruppe. Die Ala-C_α-Signale in Abb. 3.20 liegen bei 49,3 ppm (C-terminal), 51,3 ppm (N-terminal) und 52,2 ppm. Vergleicht man diese mit den Ala-C_α-Signalen von BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe (Abb. 3.16) bei 49,7 ppm und 51,9 ppm, so findet man keine wesentliche Änderung der Signallagen. Es tritt also kein stärkerer Einfluß der Nachbargruppen auf, wie es bei einer Zunahme der ß-Turns beobachtet werden müßte. Auch die Aufspaltung der vier Aib-C_β-Signale über einen Bereich von 0,8 ppm wird in dieser Größenordnung bereits in den Spektren der Tripeptide in Abb. 3.18 und 3.19 gefunden. Im Pentapeptid mit höherem Aib-Anteil (Abb. 3.21) findet man zwar das C_α-Signal von Alanin in Position 4 bei 50,8 ppm (vgl. BOC-Aib-Ala-Aib-OMe in Abb. 3.18 mit Ala-C_α = 50,6 ppm), das C_α von Alanin in Position 2 tritt jedoch bei 53,2 ppm stark tieffeldverschoben auf. Aus diesem Befund ebenso wie aus der starken Aufspaltung derAib-C_β-Signale um insgesamt 3 ppm muß auf eine Konformationsveränderung mit starker Abschirmung durch Nachbargruppen geschlossen werden. Diese Entwicklung ist bei BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH (Abb. 3.22) mit seinem signifikanten α-Helixgehalt bereits abgeschlossen.

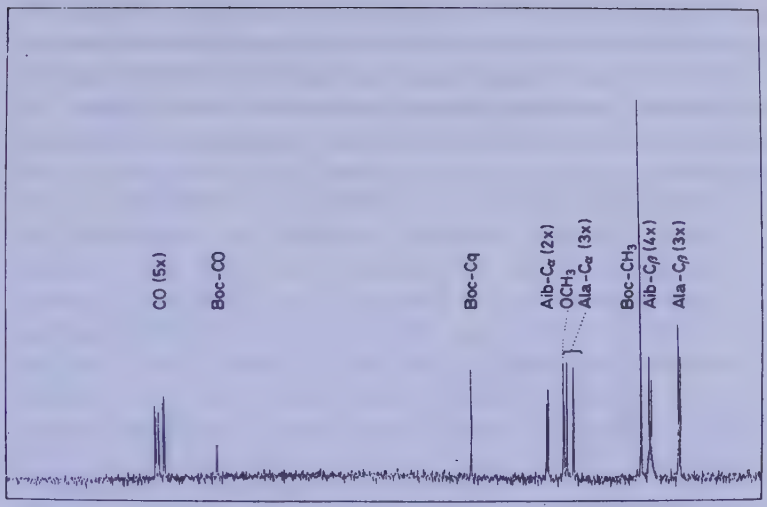


Abb. 3.20 ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OMe in ^{12}C,^{2}H-Methanol

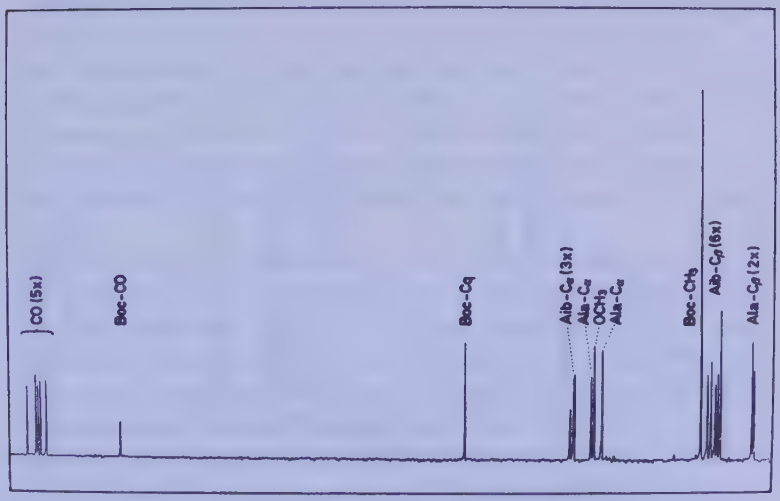


Abb. 3.21 ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OMe in ^{12}C,^{2}H-Methanol

Die Aufspaltung der Aib-C_β-Signale um insgesamt 4,2 ppm ist noch deutlicher geworden. Im Gegensatz zum Pentapeptid Abb. 3.21 mit den gleichmäßig verteilten Aib-C_β-Signalen bildet sich hier eine Aufspaltung in zwei C_β-Signalgruppen aus, deren Zentren um 3,2 ppm auseinander liegen.

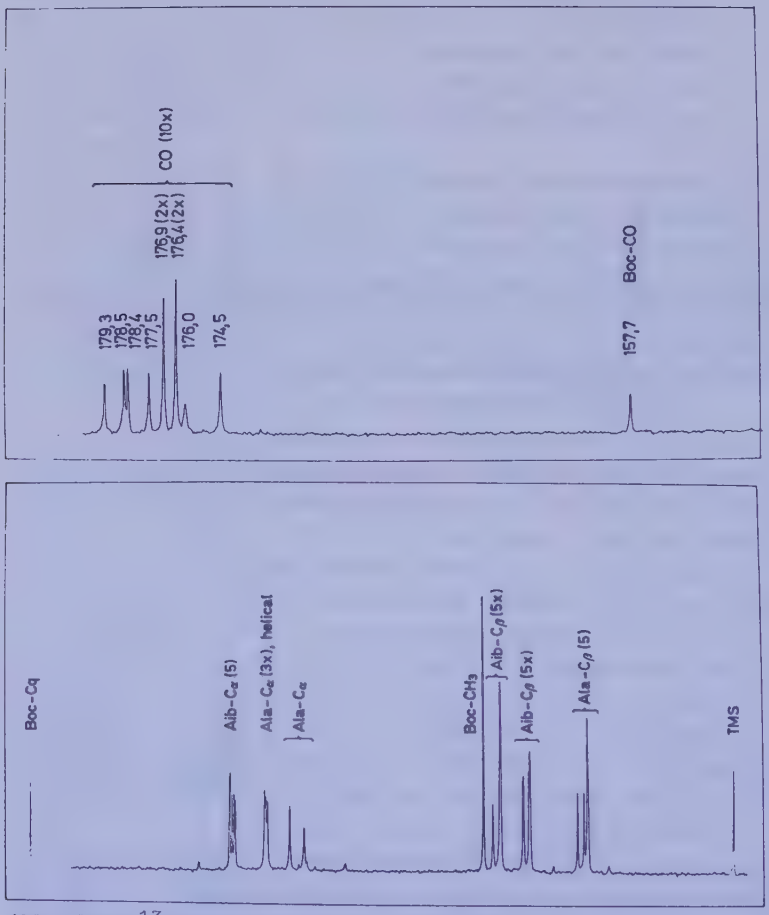


Abb. 3.22 ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH in $^{12}C,^2H$-Methanol
oben: Spektrum des expandierten Carbonylbereichs;
unten: Spektrum des expandierten Aliphatenbereichs.

Die ^{13}C-NMR-Spektren des Dekapeptids mit freier Carboxylgruppe und des Dekapeptid-POE-Esters (Abb. 3.11,c)weisen gleiche chemische Verschiebungen auf, allerdings ist das Spektrum der konventionell synthetisierten Peptid-Säure besser aufgelöst. Für die Zuordnung der Signale und den Vergleich mit Alamethicin gelten die in Abschnitt 3.3.1. beschriebenen Ausführungen. Zur Identifizierung des Dekapeptids ist jedoch zu bemerken, daß infolge der besseren Auflösung im Carbonylteil 8 Aminosäuresignale beobachtet werden, von denen zwei das doppelte Integral aufweisen; also können alle zehn Aminosäure-Carbonylgruppen sicher identifiziert werden. Ferner erkennt man 5 Aib-C_α-, 5 Ala-C_α und 3 Ala-C_β-Signale (Integral 1:1:3), so daß einschließlich der drei Signale für die tert -Butyloxycarbonylgruppe die Identität dieses Peptids durch das ^{13}C-NMR-Spektrum eindeutig belegt ist.

Als letztes Peptidfragment wird in Abb. 3.23 das ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe gezeigt, dem C-terminalen Hexapeptidfragment des Nonadekapeptids (Ia). Hierbei tritt wie schon im Tripeptid BOC-L-Pro-Ala-Aib-OMe in Abb. 3.15 eine Aufspaltung der Signale von Prolin, Alanin und BOC-CO infolge Z/E-Isomerie der Amidbindung am Pyrrolidin-Ring von Prolin auf. Die Intensitätsverhältnisse der aufgespaltenen Signale (Tab. 3.5) zeigen eine ähnliche freie Enthalpie für das Z- und E-Isomere, wobei die E-Form nur noch um $\Delta G^0 = -0{,}3$ KJ/mol begünstigt ist (Berechnung wie beim Tripeptid in Abb. 3.15).

Die Lage der Glutaminsäure-, Glutamin- und Benzylestersignale ist identisch mit der im Tripeptid BOC-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Abb. 3.19). Die schwachen Aufspaltungen der Aib-C_β-Signale um 0,7 ppm und die geringe Tieffeldverschiebung des Ala-C_α bei 51,1 (E) bzw. 51,8 ppm (Z) könnten durch ß-Turn-Konformationsanteile in größtenteils ungeordneter ρ-Konformation erklärt werden.

Abb. 3.23 ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu (OBzl)-Gln-OMe in $^{12}C,^{2}H$-Methanol

Tab. 3.5 Chemische Verschiebungen und Intensitäten von BOC-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe-Signalen mit Z/E-Isomerie

Zuordnung		E δ (ppm)	Z δ (ppm)	Δppm	Intensität (%) E	Intensität (%) Z
BOC	CO	156,1	156,8	0,7	54,5	45,5
Pro	Cα	61,9	61,2	0,7	56	44
	Cß	ver-deckt	31,5	-	-	-
	Cγ	"	26,2	-	-	-
	Cδ	47,9	48,2	0,3	53	47
Ala	Cα	51,1	51,8	0,7	53	47
	Cß	17,7	17,1	0,6	52,5	47,5

Das ^{13}C-NMR-Spektrum des Nonadekapeptids BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Abb. 3.24) weist infolge der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge von 35 mg ein relativ ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis auf. Dennoch lassen sich neben der sicheren Zuordnung der C-Atome auch Konformationsaussagen aus den Verschiebungen einzelner charakteristischer Signale ableiten. Im expandierten Carbonylteil erkennt man neben dem hochfeldabgesetzten BOC-CO-Signal bei 158,7 ppm noch 19 Signale. Zwei dieser Signale, bei 170,4 ppm und 177,5 ppm, besitzen doppelte Intensität und entsprechen somit jeweils zwei Carbonylresonanzen. Diese 21 Aminosäurecarbonylgruppen werden für das Nonadekapeptid (Ia) unter Einbeziehung der zwei γ-Glx-Carbonylgruppen erwartet. Die fünf mit Stern (*) bezeichneten Signale treten im Spektrum von BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH (Abb. 3.22) mit gleicher chemischer Verschiebung auf.

Im Aromatenbereich findet man die Signale der Benzylestergruppierung bei C_1 = 138,3 ppm, $C_{3/5}$ = 130,1 ppm und $C_{2/4/6}$ = 129,7 ppm wie schon im C-terminalen Hexapeptid in Abb. 3.23. Auch die CH_2-Benzylabsorption liegt unverändert bei 67,3 ppm.

Die charakteristischen tert -Butyloxycarbonylsignale treten neben dem bereits erwähnten CO-Signal bei 81,2 ppm (C-quartär) und bei 28,8 ppm (CH_3) auf.

Betrachtet man den Aliphatenbereich, so sieht man bei höchstem Feld drei Ala-C_β-Signale bei 16,8, 17,1 bzw. 17,7 ppm, deren Integrale sich wie 1:5:1 verhalten. Das intensive Signal bei 17,1 ppm weist auf eine magnetische Äquivalenz der 5 Ala-C_β-Signale in einer helikalen Konformation hin, während das C_β-Signal bei 17,7 ppm durch Vergleich mit Abb. 3.23 dem Ala-15 im C-Terminus mit nichthelikaler Konformation zugeordnet werden kann. Die Aib-C_β-Signale sind wieder deutlich in zwei Gruppen aufgespalten, befinden sich also hauptsächlich in helikaler Umgebung. Die Aufspaltung um 3,9 ppm entspricht den schon erwähnten Werten von Alamethicin mit 3,5 ppm (10) bzw. Trichotoxin A-50 mit 4 ppm (38).

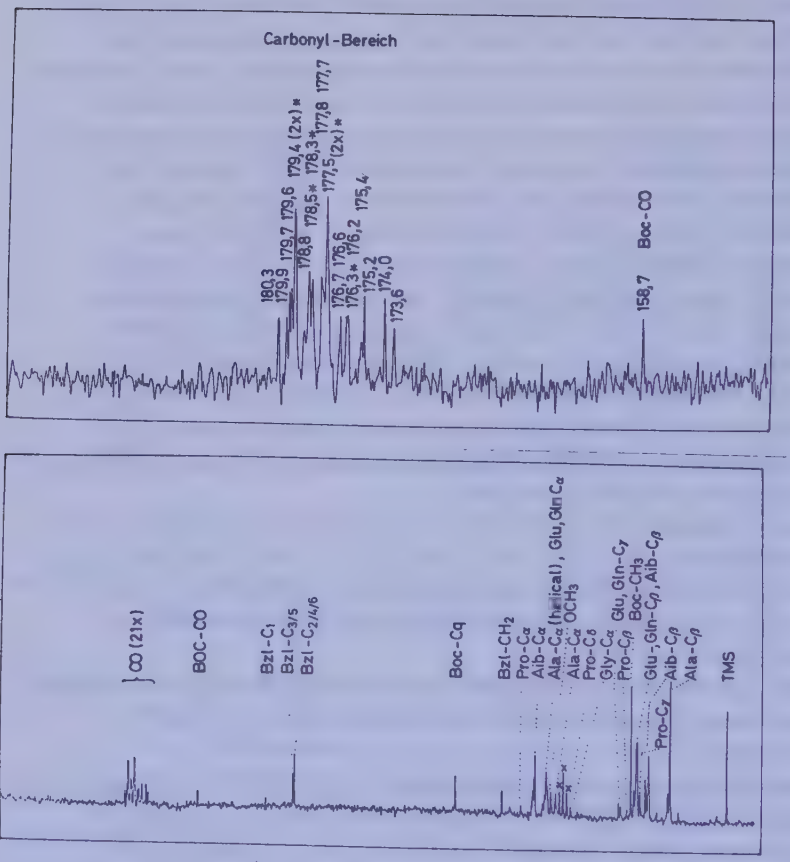


Abb. 3.24 ^{13}C-NMR-Spektrum von BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe in ^{12}C,^{2}H-Methanol
oben: expandierter Carbonylbereich
unten: Gesamtspektrum

*diese Carbonylsignale treten auch im Spektrum von BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH (Abb. 3.22) auf.

Die Ala-C_α-Signale sind mit 54,4 ppm, 54,0 ppm (2x) und 53,7 ppm (3x) noch weiter tieffeldverschoben als im Dekapeptid (Abb. 3.22) bzw. Alamethicin (10). Dies kann durch eine stärkere magnetische Nichtäquivalenz als Folge eines größeren α-Helix-Dipolmoments erklärt werden und bestätigt die Ergebnisse der CD-Konformationsanalyse (Abb. 3.8). Nur eines der Ala-C_α-Signale liegt mit 51,2 ppm im nichthelikalen Bereich und entspricht dem schon bei Ala-C_β ermittelten Ala-15.
Ein weiteres Indiz spricht für die Ausbildung der Helix bis Aib-13; der Methylenkohlenstoff des Glycins absorbiert nämlich bei 46,9 ppm sehr stark nach tiefem Feld verschoben (in Alamethicin 44,8 ppm, in Trichotoxin A-50 45,9 ppm). Das Pro-C_α ist dagegen gegenüber dem Hexapeptid (Abb. 3.23) überhaupt nicht verschoben.
Die Signalgruppe um 49 ppm entspricht dem Methanol-Heptett und tritt trotz Verwendung von $^{12}C,^{2}H$-Methanol durch die große Anzahl Interferogramme auf. Alle ^{13}C-spektroskopisch untersuchten Peptide sind somit widerspruchsfrei erklärt und die Konformationsaussagen zeigen gute Übereinstimmung mit den aus CD- und FIR-Daten abgeleiteten Ergebnissen. In Tab. 3.6 sind ^{13}C-chemischen Verschiebungen der unter 3.3.2. diskutierten Verbindungen zusammengefaßt.

Tab. 3.6 ^{13}C-chemische Verschiebungen* der unter 3.3.2. diskutierten Peptide

Verbindung	CO-Signale	Aib		Ala		Gly
		C_α	C_β	C_α	C_β	C_α
BOC-Gly-L-Ala-Aib-OMe (Abb.3.14)	176.3;173.9;172.0	57,1	25,2	49,8	18,3	44,8
BOC-L-Pro-Ala-Aib-OMe (Abb.3.15)	176,1;175,0;174,0(I/II) 173,7	56,9	25,3	49,9(I) 49,7(II)	18,3(II) 17,6(I)	
BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe (Abb.3.16)	176,5;175,2;174,6	57,7	26,2; 26,0	51,9 49,7	17,7 17,4	
BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe (Abb.3.18)	177,2;176,4;174,2	57,3 57,1	26,1; 25,3 25,5; 25,1	50,6	17,7	
BOC-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Abb.3.19)	177,6;177,4;174,4 173,6;173,3	57,5	26,1; 25,3			
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OMe (Abb.3.20)	176,7;176,5;175,6 174,2;173,9	57,6 57,2	25,9(2) 25,6; 25,2	52,2 51,3 49,3	17,0(2) 16,4	
BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OMe (Abb.3.21)	178,7;176,8;176,3 175,7;174,4	58,0 57,2 57,0	27,3; 25,5 26,5; 25,0 24,4(2)	53,2 50,8	17,4 16,9	
BOC-(Aib-L-Ala)$_3$-OH (Abb.3.22)	179,3;178,5;178,4 177,5;176,9(2) 176,4(2);176,0;174,5	58,0 57,9 57,7 57,4 57,3	24,3(2) 27,7;24,2 26,9(4); 25,7 25,5	53,9 53,8 53,6 51,0 49,3	18,1 17,4 16,9(3)	
BOC-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Abb.3.23)	177,5(2);176,8 175,7;175,5;175,4 174,1;173,3	58,1 57,8	25,7; 25,5 25,0	51,8(I) 51,1(II)	17,7(II) 17,1(I)	
BOC-(Aib-L-Ala)$_3$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Abb.3.24)	180,3;179,9;179,7 179,6;179,4(2) 178,8;178,5;178,3 177,8;177,7;177,5(2) 176,7;176,6;176,3 176,2;175,4;175,2 174,0;173,6	58,4 57,9 57,7(2) 57,4(3)	24,5 27,1(3); 24,1 25,6(2) 26,8(3) 24,3 25,2	54,4 54,0(2) 53,7(3) 51,2	17,7 17,1(5) 16,8	46,9

* in ^2H-Methanol relativ zu internem Tetramethylsilan (d=0ppm); relative Intensitäten sind Klammern angegeben.

** a)Glutaminsäure, b)Glutamin

Pro				Glx**			ROO			Obe	OBal			
C_α	C_β	C_γ	C_δ	C_α	C_β	C_γ	CH_3	C_α	OO		CH_2	C_1	$C_{3/5}$	$C_{2/4/6}$
							28,6	80,6	158,3	52,8				
61,3	32,3(I) 31,4(I)	- (I) 24,6(II)	48,2(I) 47,8(II)				28,7	81,2	156,4(I) 155,8(II)	52,7				
							28,7	80,7	157,8	52,6				
							28,8	80,8	157,0	52,7				
				a)54,2 b)53,3	b)28,0 a)27,6	b)32,4 a)31,3	28,8	80,8	157,0	52,7	67,3	137,5	129,5	129,1
							28,4	80,7	157,9	52,5				
							28,7	80,9	157,4	52,6				
							28,8	81,1	157,7					
61,9(II) 61,2(I)	- (II) 31,5(I)	26,2(I) - (II)	48,2(I) 47,9(II)	a)54,7 b)53,3	b)28,1 a)27,4	b)32,5 a)31,9	28,8	81,5	156,8(I) 156,1(II)	52,7	67,3	137,7	129,6	129,2
61,5	30,2	26,4(I) 26,3(II)	48,0	a)55,1 b)53,4	28,0(2)	b)32,7 a)32,0	28,8	81,2	158,7	52,6	67,2	138,3	130,1	129,7

4. Membranmodifizierende Wirkung

4.1. Dosis-Wirkungskurven der Hämolyse

Der Zusatz steigender Mengen des synthetischen Nonadekapeptids BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe führt bei der Hämolyse von Human-Erythrozyten zu sigmoiden Dosis-Wirkungskurven (Abb. 4.1), wie sie in früheren Untersuchungen für viele Peptidantibiotika aus Trichoderma gefunden wurden (19,22,38). Dabei wird das synthetische Peptid im gleichen Konzentrationsbereich wirksam wie die natürlichen; dieser liegt etwa eine Zehnerpotenz unterhalb dem des weniger aktiven Natriumdodecylsulfat (SDS) und eine Zehnerpotenz über dem des Mellitin (19). Gegenüber den natürlichen Analoga ist die Aktivität des synthetischen Produktes nur geringfügig kleiner, was bei der stark modifizierten Sequenz bemerkenswert erscheint. Die hämolytische Aktivität vergleicht man am besten über die Peptidkonzentration C_{50}, bei der 50 % Hämolyse erzielt werden; hier ist die Extinktion (λ = 546 nm) des freigesetzten Hämiglobincyanid auf die Hälfte zurückgegangen, bezogen auf die Extinktion 0,5 bei vollständiger Hämolyse. Für das synthetische Nonadekapeptid (Ia) ergibt sich C_{50} = 1,8 x 10^{-5} mol/l, während für Alamethicin F-50 C_{50} = 1,4 x 10^{-5} mol/l und für Trichotoxin A-40 C_{50} = 1,1 x 10^{-5} mol/l gefunden werden. Ganz anders verhält sich dagegen das Hexadekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe. Trotz der Analogie zum Nonadekapeptid im N-terminalen und C-terminalen Bereich zeigt das um drei Aminosäuren kürzere Peptid bis zu einer Konzentration von 7 x 10^{-5} mol/l keinerlei lytische Aktivität an Human-Erythrozyten. Bei dieser Konzentration lysiert Natriumdodecylsulfat bereits zu 80 %.
Als mögliche Erklärung der beobachteten Aktivitätsunterschiede bietet sich die Zunahme des lipophilen helikalen Bereichs vom Hexadeka- zum Nonadekapeptid mit zunehmender Flexibilität des Peptidbackbone durch das eingefügte Glycin an.

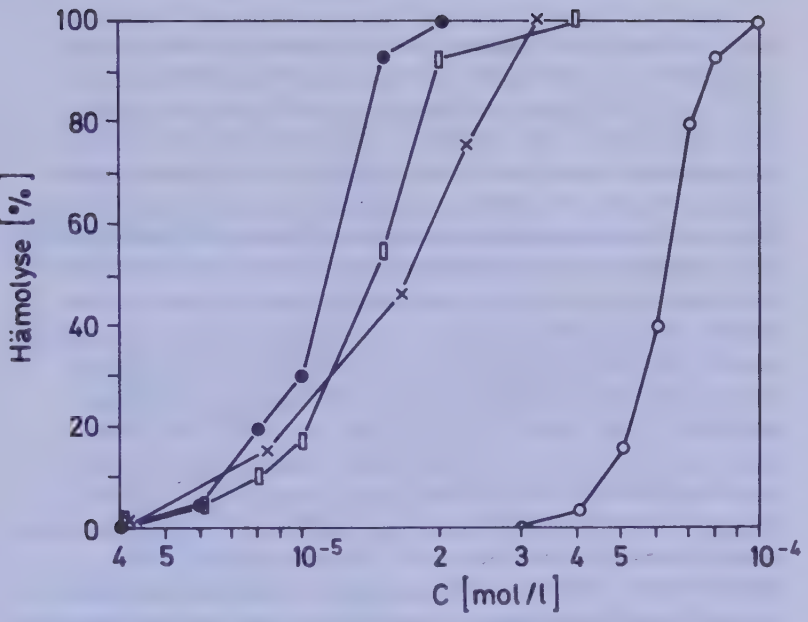


Abb. 4.1 Konzentrationsabhängigkeit der Hämolyse von Human-Erythrozyten durch das synthetische Nonadekapeptid (Ia), (x) im Vergleich zu den aus (19) übernommenen Werten Alamethicin F-50 (□), Trichotoxin A-40 (•) und SDS (o); Bedingungen: Phosphatpuffer pH 7; 100 % Hämolyse ≙ E_{546} = 0,5 ; Inkubationszeit 60 min; Temperatur 37°C.

Die Entscheidung, ob bei der membranlysierenden Wirkung die Länge des helikalen Bereiches (bis zum Prolin) entscheidend ist, oder ob durch die Gegenwart von Glycin spezifische Konformationsmerkmale auftreten, läßt sich aus den dargestellten Versuchen nicht zweifelsfrei herleiten. Ein Modellpeptid, bei dem Glycin durch Aib ersetzt wäre, würde zur Lösung dieser Frage wesentlich beitragen.

4.2 Untersuchungen an künstlichen Lipid-Doppelschichten+

Eine erstaunliche Eigenschaft von Alamethicin und seinen Analoga ist die Fähigkeit bereits in Konzentrationen ab 10^{-8} mol/l die Ionenleitfähigkeit künstlicher Membranen zu erhöhen (24). Beim Anlegen einer Spannung über eine Lipidmembran induzieren diese Peptide Leitfähigkeitsänderungen, die von der Größe der angelegten Spannung abhängen (31). Bei geringen Antibiotikakonzentrationen treten sprunghaft Leitfähigkeitsänderungen auf, die auf das spontane Entstehen und Zerfallen einzelner Porenstrukturen in der Membran zurückgeführt werden. Das synthetisierte Nonadekapeptid (Ia) führt ebenso wie die natürlichen Peptidantibiotika zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit künstlicher Membranen, wie in Abb. 4.2 gezeigt wird. Es sind jedoch nicht wie bei einzelnen Alamethicin-Poren verschiedene Leitfähigkeitszustände zu erkennen, sondern es wird der folgende Effekt beobachtet. Nach Zugabe des vollgeschützten Nonadekapeptids (Ia) bleibt die Membran anfangs ruhig. Danach treten Spikes und Spikefolgen -sog. Bursts- auf, die immer häufiger werden. Schließlich wird ein bestimmter Schwellenwert in der Leitfähigkeit überschritten, oberhalb dessen die Membranleitfähigkeit immer schneller anwächst, bis die Membran schließlich platzt. Der Vorgang läuft umso schneller ab, je höher die Membranspannung bzw. Peptidkonzentration ist. Bei zu großen Peptidkonzentrationen lassen sich keine Membranen mehr bilden. Ähnliche Effekte wurden kürzlich auch mit Mellitin (19,137,138) beobachtet. Als Ursache der Leitfähigkeitserhöhung der Membran können zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden: die Porenbildung und die Detergenswechselwirkung. Die Detergenswirkung beruht darauf, daß sich Tensidmoleküle aufgrund hydrophober Wechselwirkung in die Membran einlagern. Bei niedrigen Konzentrationen führt dies zu einer Störung der geordneten Membranstruktur und infolge der vergrößerten Anzahl von Fehlstellen zu einer erhöhten Ionenleitfähigkeit.

+Prof. Dr. G. Boheim und W. Hanke, Bochum, danke ich vielmals für die Durchführung und Interpretation der Messungen.

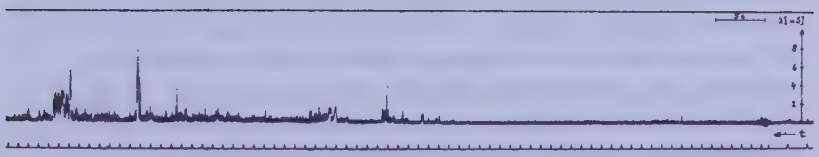


Abb. 4.2 Leitfähigkeitserhöhung einer künstlichen Lipid-Membran nach Zugabe von Nonadekapeptid (Ia)
Membranlösung : 2 % Asolectin + 0,4 % Cholesterin in Dekan
Salzlösung : 1 m KCl in beiden Kammern
Membranspannung : 90 mV
Temperatur : 22°C

Bei höheren Tensidkonzentrationen führt dies zu einem Herauslösen von Lipiden aus der Membran infolge Mizellenbildung durch die Tenside und schließlich zum Auflösen der gesamten Struktur. Die Porenleitfähigkeit hingegen resultiert aus der Bildung einer spezifischen Struktur durch Proteinmoleküle in der Membran, wobei die Störung der Lipidstruktur auf diesen lokalen Bereich beschränkt bleibt.
Ein reiner Detergenseffekt des synthetischen Polypeptids läßt sich wahrscheinlich dadurch ausschließen, daß eine Spannungsabhängigkeit der Spikefolgefrequenz gefunden wird, obwohl ein definierter Leitfähigkeitszustand nicht aufgelöst und beobachtet werden konnte. Dies bedeutet, daß eine Erniedrigung der Membranspannung zu einer Leitfähigkeitsabnahme führt, der Effekt des Nonadekapeptids auf die Membran bis zu einem gewissen Grad also reversibel ist. Zusätzlich findet man bei Zugabe des synthetisierten Polypeptids zu Alamethicin ein Anwachsen der Lebensdauer der Alamethicin-Porenzustände um einen Faktor 2-3, was bei Zugabe natürlicher Alamethicin-Analoga oder Detergentien

bisher nicht beobachtet wurde. Liegt das Nonadekapeptid in größeren Konzentrationen vor, so scheint es mit Alamethicin um einen Platz in der Membrangrenzfläche zu kompetieren.
Das nach Hydrieren des vollgeschützten Nonadekapeptids (Ia) erhaltene Peptid (Ib) mit freier Carboxylgruppe an Glu-18 ist um den Faktor 5-10 weniger aktiv. Diese Tendenz wird auch bei den natürlichen Peptiden beobachtet; wenn man die freie Carboxylgruppe z.B. von Trichotoxin A-40 mit Diazomethan verestert steigt die Aktivität sowohl bei den Bilayer- als auch den Lyseexperimenten an (19). Das Hexadekapeptid (II) zeigt andererseits wie schon bei der Hämolyse keinerlei Aktivität an künstlichen Lipid-Doppelschichten.
Aus der membranmodifizierenden Wirkung der Nonadekapeptide (Ia) und (Ib) kann man folgern, daß hierbei eine Konkurrenz zwischen einem Detergens-Charakter und einer Tendenz zur Porenbildung über Selbstaggregation besteht. Während in der Reihe Alamethicin, Suzukacillin, Trichotoxin der porenbildende Charakter immer mehr abnimmt, zeigen die beiden synthetischer Peptide (Ia) und (Ib) noch stärkeren Detergens-Charakter. Es sind so viele Moleküle in die Membran eingelagert, daß sich diese auflöst, bevor stabile Poren gebildet werden. Bei den kurzlebigen Bursts handelt es sich möglicherweise um latente, porenähnliche Strukturen, die durch Autokorrelationsanalyse (139) untersucht werden könnten.
Mit den synthetischen membranmodifizierenden Peptiden (Ia,b) läßt sich zeigen, daß ein helikaler Bereich zur Porenbildung zwar notwendig, jedoch nicht hinreichend ist. Verglichen mit den natürlichen Peptiden, die im helikalen Bereich jeweils ein polares Glutamin aufweisen und N-terminal statt der tert -Butyloxycarbonyl- eine Acetylgruppe besitzen, sind die synthetisierten Peptide im helikalen Teil wahrscheinlich zu hydrophob. Zur weiteren Untersuchung sollten synthetische Peptide mit weniger hydrophobem Helixbereich dargestellt werden. Dazu bietet sich eine Abspaltung

der Schutzgruppe am N-Terminus an, ferner wäre ein Peptid mit eingeschobenem Glutamin im Helixbereich zur Interpretation der Membranphänomene sehr nützlich.

5. Ergebnisse und Diskussion

Die Nonadekapeptide (Ia,b) und das Hexadekapeptid (II) stellen die ersten durch konventionelle Synthese dargestellten Analoga des Peptidantibiotikums Alamethicin dar.
Die Fragment- und Schutzgruppenauswahl für die Synthese des Hexadeka- bzw. Nonadekapeptids erweist sich bezüglich der Kupplungsausbeuten und Nebenreaktionen als recht günstig. Eine etwas unbefriedigende Ausnahme bildet nur der Aufbau des Hexapeptids BOC-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe. Dieses C-terminale Fragment konnte aus den beiden Tripeptiden BOC-L-Pro-Ala-Aib-OH und H-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH in nur 15 % Ausbeute synthetisiert werden. Die beiden sterisch gehinderten, α-verzweigten α-Aminoisobuttersäurereste an der Verknüpfungsstelle gaben Anlaß zur Bildung mehrerer Nebenprodukte. Für weitere präparative Arbeiten sollte daher eine Darstellung des Hexapeptids über die bereits synthetisierten Dipeptidfragmente BOC-L-Pro-Ala-OMe, BOC-Aib-Aib-OMe und BOC-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe versucht werden.
Modellvorstellungen zur membranmodifizierenden Wirkung dieser amphiphilen Peptide lassen sich nur nach genauer Kenntnis ihrer Sekundärstruktur entwickeln. Zu grundlegenden Konformationsaussagen werden die spektroskopischen Untersuchungen der Peptid-Polymer-Ester BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_n$-OPOE (n = 1 bis 7) und BOC-L-Ala-$(Aib\text{-}Ala)_m$-OPOE (m = 1 bis 6) bzw. der entsprechenden N-demaskierten Verbindungen herangezogen. Für diese Modellpeptide werden bei der Konformationsermittlung sowohl aus den CD-Spektren (Abb. 3.1 und 3.2), als auch aus den FT-FIR-Spektren (Abb. 3.9 und 3.10) und PFT-^{13}C $\{^{13}C\text{-}^{1}H\}$ -NMR-Spektren (Abb. 3.11 und 3.12; Tab. 3.3) übereinstimmende Ergebnisse erhalten.
Neben der Lage und Breite der Absorptionsbande in den FIR-Spektren (Abb. 3.9) und der Aufspaltung der C_β-Signale für die diastereotopen Methylgruppen in α-Aminoisobuttersäure (Tab. 3.3), führt die CD-Konformationsanalyse (Tab. 3.2)

aufgrund der charakteristischen Lage und des Vorzeichens der Cotton-Effekte zu folgenden Konformationen.
Die N-geschützten Tri- bis Hexapeptid-Polymer-Ester werden durch einen ß-Turn stabilisiert, der beim Tripeptid-Ester am stärksten ausgeprägt ist.
Beim Heptapeptid BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_3$-OPOE zeichnet sich in den Spektren ein Konformationswechsel zur α-Helix ab:

a) Erstmalig tritt in den CD-Spektren das für die α-Helix charakteristische "exciton splitting" des $\pi\pi^+$-Überganges bei 194 nm (+) und 204 nm (-) auf (84,85).
b) Ferner findet man im FIR-Spektrum erstmals Absorptionen bei 329 cm^{-1} und 378 cm^{-1}, die bei α-helikaler Konformation u.a. für Poly-L-Alanin beobachtet werden (129).
c) Im IR-Spektrum der N-geschützten Peptid-Polymer-Ester in Tetrachlorkohlenstoff zeigt die graphische Darstellung der Amid-A-Bandenlage gegen die Zahl der Aminosäurereste in der Peptidkette (Abb. 5.1) eine Abnahme der Frequenz bis zu einem Grenzwert von 3287 cm^{-1}, der ab dem Heptapeptid erreicht wird (47).

Ab dem Octapeptid BOC-$(Aib-L-Ala)_4$-OPOE steigt der Helix-Gehalt mit zunehmender Kettenlänge bis zum Tetradekapeptid BOC-$(Aib-L-Ala)_7$-OPOE kontinuierlich an. CD-Konformationsanalysen nach verschiedenen Methoden (Tab. 3.2) ergeben einen Anstieg des mittleren α-Helix-Gehaltes in Ethanol von 4 % beim Octapeptid bis 40 % beim Tetradekapeptid (Abb. 3.8). Übereinstimmend findet man auch eine stetige Intensitätszunahme der beiden FIR-Absorptionsbanden im Bereich 330 cm^{-1} und 370 cm^{-1} vom Heptapeptid bis zum Dodekapeptid BOC-$(Aib-L-Ala)_6$-OPOE (Abb. 3.10). Im ^{13}C $\{^{13}C-^1H\}$ Tripel-Resonanz-NMR-Spektrum (Abb. 3.11 und Tab. 3.3) beobachtet man eine zunehmende Aufspaltung der Aib-Cß-Signale mit deutlicher Ausbildung zweier Signalgruppen und eine Tieffeldverschiebung des Ala-Cα-Signals bis 53,5 ppm beim Nonapeptid- und 53,8 ppm beim Dekapeptid. Auch dies beweist nach allen bisher durchgeführten ^{13}C-NMR-Untersuchungen an Aib-Peptiden das Vorliegen einer helikalen Konformation. Für die N-demaskierten Peptid-Polymer-Ester findet man eine ähnliche Abhängigkeit

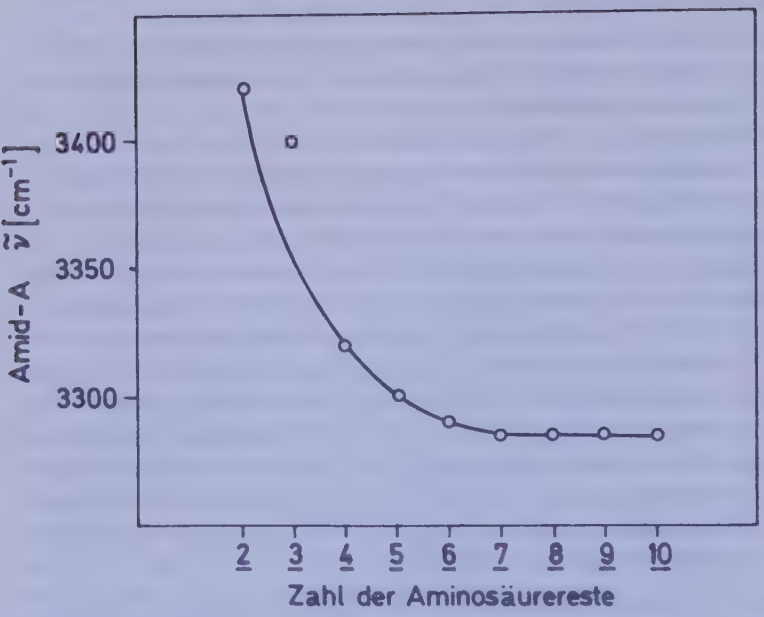


Abb. 5.1 Abhängigkeit der Wellenzahl der Amid-A-Bande von der Zahl der Aminosäurereste im Peptid-Polymer-Ester

der Konformation von der Kettenlänge, nur tritt durch die Ladung des protonierten N-Terminus eine höhere Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel ein, welche zu einer geringeren Stabilität der intramolekularen Wasserstoffbrükkenbindungen der α-Helix führt. Entsprechend findet man bei den N-protonierten Peptid-Polymer-Estern stets einen kleineren α-Helix-Gehalt als bei den N-geschützten gleicher Länge.

Aus Abb. 3.3 und 3.4 wird ersichtlich, daß die Peptid-Polymer-Ester alternierender Aib-L-Ala-Sequenz, verglichen mit BOC-L-Ala$_n$-OPOE gleicher Länge (99), deutlich größere

α-Helix-Stabilität gegenüber Temperaturerhöhung und Lösungsmitteländerung besitzen. Ein derart ausgeprägtes stabiles Helixsegment wurde auch bei Alamethicin festgestellt. Schließlich mußte noch geklärt werden, ob die bei den Peptid-Polymer-Estern erhaltenen spektroskopischen Ergebnisse auf entsprechende freie Peptide ohne Polymer-Ester-Bindung übertragbar sind. Der CD-spektroskopische Vergleich der Peptid-Polymer-Ester BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_2$-OPOE bzw. BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-OPOE mit den unabhängig auf konventionelle Weise synthetisierten Peptiden BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_2$-OMe bzw. BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-OMe (Abb. 3.6) zeigt völlige Übereinstimmung der entsprechenden CD-Spektren. Auch in den ^{13}C-NMR-Spektren von BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-OPOE (Abb. 3.11,c) und BOC-$(Aib-L-Ala)_5$-OH (Abb. 3.22) bzw. BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_2$-OPOE (Abb. 3.11,a) und BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_2$-OMe (Abb. 3.20) werden dieselben chemischen Verschiebungen gefunden. Bei der Gegenüberstellung der CD-Spektren von Peptid-Polymer-Esternund der entsprechenden durch Hydrazinolyse abgespaltenen Peptidhydrazide (Abb. 3.5), ergibt sich ein qualitativ ähnlicher Kurvenverlauf, jedoch sind die Elliptizitäten und somit auch der α-Helix-Gehalt der Peptidhydrazide stets höher als für entsprechende Peptid-Polymer-Ester. Mit diesem Ergebnis ist auch die Interpretation des ^{13}C-NMR-Spektrums des Octapeptids BOC-$(Aib-L-Ala)_4$-$NH-NH_2$ (Abb. 3.13) vereinbar, das mit einer Aufspaltung der Aib-C_β-Signale um 4,2 ppm und der Tieffeldverschiebung der Ala-C_α-Signale bis 54,0 ppm sogar die entsprechenden Daten des Nonapeptids BOC-L-Ala-$(Aib-Ala)_4$-OPOE noch übertrifft (Abb. 3.11,b, Tab. 3.3). Zur Erklärung dieser Abweichung kann man annehmen, daß die Hydrazidgruppe aufgrund ihrer Stickstoff-Elektronenpaare Wasserstoffbrückenbindungen zu weiteren Carbonylgruppen ausbildet, die zu einer Erhöhung des α-Helix-Gehaltes führen.

Diese Untersuchungen belegen somit eindeutig, daß die Ergebnisse der spektroskopischen Daten der Peptid-Polymer-Ester vollständig auf konventionell synthetisierte Peptide

übertragbar sind. Dies konnte auch von Mutter (100) an Poly-L-Glu_n-Gly-Derivaten beobachtet werden.
Die CD-Spektren des Nonadekapeptids (Ia) und des Hexadekapeptids (II), sowie der natürlichen Peptidantibiotika Alamethicin F-50 und Trichotoxin A-40 werden in Abb. 3.7 neben den Spektren einiger zur Synthese benötigten Peptidfragmente gezeigt. Dabei fällt auf, daß das Hexadekapeptid BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (II) mit 24 % einen ähnlichen mittleren Helix-Gehalt aufweist, wie sein N-terminales Dekapeptidfragment BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-OMe mit 28 % bzw. polymerverestert mit 23 %. Eine Vergrößerung des Helix-Anteils wird also durch das backboneverändernde Prolin an der Verknüpfungsstelle verhindert. Dieser Befund ist im Hinblick auf eine zur Diskussion stehende 3_{10}-Helix nicht trivial. Das Nonadekapeptid BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Ia) mit dem eingeschobenen Tripeptid Gly-Ala-Aib, weist dagegen einen mittleren α-Helix-Gehalt von 44 % auf und übertrifft damit noch den Wert des Tetradekapeptids BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_7$-OPOE mit 40 %. Alamethicin liegt mit seinem α-Helix-Gehalt von 35 % zwischen den beiden synthetisierten Peptiden und entspricht dem Dodekapeptid BOC-$(Aib\text{-}L\text{-}Ala)_6$-OPOE mit 33 % α-Helix-Anteil.
Durch Umrechnung der α-Helix-Anteile in die Anzahl der Aminosäurereste in der α-Helix (Abb. 3.8) findet man

Hexadekapeptid II 3-4 Aminosäuren ≙ 1 Helixwindung
Alamethicin F-50 6-7 Aminosäuren ≙ 2 Helixwindungen
Nonadekapeptid Ia 9 Aminosäuren ≙ 3 Helixwindungen

Übereinstimmend fanden Burgess und Leach (17) durch theoretische Konformationsberechnungen sechs Aminosäurereste in der Helix von Alamethicin.
Diese Resultate stehen in einem interessanten Zusammenhang zu den membranmodifizierenden Wirkungen der Peptide. So wirkt das Hexadekapeptid (II) weder lysierend auf Humanerythrozyten, noch zeigt es eine Leitfähigkeit an künstlichen Lipid-Doppelschichten. Die Hämolyseaktivität des Nonadekapeptids (Ia) ist dagegen ähnlich groß wie die von Alamethicin

F-50 (Abb. 4.1). Ferner führt die Zugabe dieses synthetischen Peptids bei Lipid-Bilayer Experimenten zu einer Erhöhung der Membranleitfähigkeit (Abb. 4.2). Die unterschiedlichen Leitfähigkeitszustände einer Einzelpore, wie bei Alamethicin und den natürlichen Analoga Trichotoxin und Suzukacillin, konnten jedoch nicht angeregt werden.

Offensichtlich ist zur Membranüberbrückung eine gewisse Mindestlänge des lipophilen helikalen Bereichs erforderlich, der beim Hexadekapeptid (II) mit nur einer α-Helixwindung noch nicht erreicht wird. Zudem verfügt das Peptidbackbone des Hexadekapeptids durch das fehlende Glycin nichtüber dynamische Helix/Coil-Konformationen wie das Nonadekapeptid (Ia) bzw. Alamethicin. Beim Nonadekapeptid ist die Lipophilie der Helix offensichtlich bereits zu groß. Das Gleichgewicht zwischen Porenbildung und Detergens-Wirkung ist deshalb schon zu letzterer hin verschoben; ähnlich wie durch Mellitin (13,137,138) wird somit eine Zerstörung der künstlichen Membran bewirkt. Zur weiteren Untersuchung dieser Problematik bieten sich Derivate des Nonadekapeptids (Ia) mit weniger lipophilem, helikalem N-Terminus an, wie er z.B. durch Einbau von Glutamin in die Helix erreicht werden kann.
Abschließend sei noch die Frage nach einem möglichen Vorliegen einer 3_{10}-Helix in Alamethicin und seinen Analoga diskutiert.
Da die Konformation der synthetisierten Peptide und der natürlichen Peptidantibiotika stark von ihrem hohen Gehalt an α-verzweigter α-Aminoisobuttersäure beeinflußt wird, bietet sich Poly-α-Aminoisobuttersäure zu Konformationsvergleichen an. Theoretische Konformationsberechnungen von Burgess und Leach (97) weisen auf das Vorliegen einer α-Helix für Poly-α-Aminoisobuttersäure hin. Im Widerspruch hierzu stehen Elektronenbeugungsexperimente von Malcolm (56), der trotz des Auftretens einer für die α-Helix charakteristischen meridionalen Reflexion bei 1,49 Å eine 3_{10}-Helix annahm, da sich nur hiermit akzeptable Werte in der Röntgendichte ergaben. Als weiteres Indiz der 3_{10}-Helix

bei Poly-α-Aminoisobuttersäure wurde die ungewöhnlich tiefe Lage der Amid-A-Frequenz von 3275 cm^{-1} gewertet. In eigenen Untersuchungen (47) wurde jedoch für helikale Peptide der Serie BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE eine Frequenz von 3287 cm^{-1} gefunden (Abb. 6.1). Dies spricht eher für das Vorliegen einer α-Helix.

Eine Röntgenstrukturanalyse am N-terminalen Tetrapeptid von Alamethicin, Z-Aib-L-Pro-Aib-Ala-OMe (14), zeigt die Ausbildung zweier intramolekularer Wasserstoffbrücken-bindungen in zwei ß-Turns, die den Anfang einer 3_{10}-Helix darstellen könnten. Es ist allerdings etwas vermessen, von der Kristallstruktur dieses kurzen Tetrapeptids auf die Konformation eines Nonadekapeptids in lipophiler Lösung zu spekulieren.

Eine endgültige Klärung wird wohl erst die geplante Röntgen-strukturanalyse des kristallinen Dekapeptidsalzes BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-O^-Cs^+ (Abb. 2.7,d) bringen.

6. Experimenteller Teil

6.1. Chemikalien und analytische Methoden

Mit Ausnahme der α-Aminoisobuttersäure (Aib) von der Firma Cyclo Chemical, USA, wurden nur Aminosäuren der Firma Merck, Darmstadt eingesetzt. Polyoxyethylen, bifunktionell, mittlere Molmasse 6000 g/mol, wurde von der Firma Roth, Karlsruhe bezogen. Die übrigen Reagenzien wurden von den Firmen Merck, bzw. Fluka, Buchs, Schweiz, geliefert und waren je nach Erfordernis pro analysi bzw. zur Synthese. Die Lösungsmittel wurden, sofern nicht p.a. von Merck bezogen, nach den üblichen Methoden absolutiert (140).
Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} (Merck) verwendet.
Folgende Fließmittelsysteme kamen zur Anwendung:

		R_F für Dicyclohexylharnstoff
I	1-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1	0,93
II	2-Butanol/Eisessig/Wasser 67:10:23	0,94
III	1-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser 42:24:6:3	0,92
IV	Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser 65:25:3:4	0,92
V	Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4	0,83
VI	2-Butanol/Acetonitril/Wasser 3:2:1	0,91
VII	2-Butanol/3 % Ammoniaklösung 7:3	0,91

Die R_F-Werte wurden in frisch erstellten Systemen in gesättigten Kammern (Camag) ermittelt. 2 µl einer 1 % Lösung der Peptide wurden aufgetragen, Laufstrecke 10 cm (T = 23°C). Zu Vergleichszwecken wurde in jedem System der R_F-Wert von Dicyclohexylharnstoff ermittelt.
Als Sprühreagenzien wurden eine 0,3 %ige Ninhydrinlösung und anstelle des cancerogenen Chlor/o-Tolidin-Reagenzes das etwas empfindlichere Chlor/4,4'-Tetramethyldiaminodiphenylmethan (TDM)-Reagenz verwendet (141). Die lipophilen

Peptide konnten durch Ansprühen mit Wasser (19,142) indiziert werden. Peptide mit N-terminalem Prolin wurden durch Besprühen mit Isatin-Lösung (7) und die Peptidhydrazide mit dem Barton-Reagens (157) nachgewiesen.
Als stationäre Phasen in der Säulenchromatographie dienten Kieselgel-60 (70-230 mesh ASTM; Länge 30 cm; ϕ 3,3 cm) und ein reversed-phase Silicagel C-8 (Lobar RP8-Fertigsäule, Merck). Der Fraktionssammler mit optischer Einheit UA 5 war von der Firma ISCO.
Zur Aminosäureanalyse wurden ca. 250 nmol Peptid mit 1 ml 6n HCl innerhalb 24 h bei 110°C hydrolysiert. Der getrocknete Rückstand wurde in Natriumcitrat-Puffer (pH 2,2) aufgenommen und die Aminosäurezusammensetzung am Beckmann Unichrom-Analysator bzw. mit einem automatischen Biotronik Chromatographie-System LC 6000 E[+] bestimmt.
Die Schmelzpunkte wurden auf einem Monosko IV-Apparat nach Dr. Tottoli der Firma Büchi, Schweiz, bestimmt und sind nicht korrigiert.
Die Drehwerte wurden mit einem Digitalpolarimeter (OLD 5) der Firma Zeiss, Oberkochen, gemessen. Die $[\alpha]_D$-Werte wurden durch Extrapolieren bestimmt.

[+]Frau Oehling, Tübingen, danke ich für diese Analysen

6.2. Darstellung der Aminosäurederivate

6.2.1. Darstellung von tert -Butyloxycarbonylazid (BOC-N_3) (143)

Eine Lösung von 436 g (3,3 mol) Carbazinsäure-tert-butylester in 335 ml Eisessig und 100 ml Wasser wird im Eisbad auf 0° gekühlt und so langsam mit 230 g (3,33 mol) Natriumnitrit in 400 ml Wasser versetzt, daß die Temperatur zwischen 9-13°C bleibt. Anschließend wird die goldgelbe Azidschicht abgetrennt und die wässrige Phase viermal mit je 150 ml Wasser extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden je dreimal mit je 150 ml Wasser, 1n $NaHCO_3$ und wieder mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Schließlich wird am sorfältig gereinigten Rotationsverdampfer bei 40-45°C unter Wasserstrahlvakuum abdestilliert (Explosionsgefahr!). Ausbeute 430 g (91 %); Kp. 42°C (14 Torr); Lit. (143) 36,5-37,5°C (10 Torr).

6.2.2. Darstellung von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt); (144)

157 g (1 mol) o-Chlornitrobenzol werden mit 157 g (3 mol) Hydrazinhydrat 4 h am Rückflußkühler gekocht. Das Reaktionsgemisch wird mit 100 ml Wasser aufgenommen und daraus wird 1-Hydroxybenzotriazol mit 600 ml 1n HCl als dicker gelblich-weißer Niederschlag ausgefällt. Nach Abnutschen und Auswaschen mit kaltem Wasser wird zweimal aus Ethanol/Wasser (1:2) umkristallisiert. 1-Hydroxybenzotriazol wird als weißes Pulver isoliert und bei 90°C über P_2O_5 am Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 101 g (75 %); Fp. 156°C, Lit. (65) 156°C.

$C_6H_5N_3O$ (135,1) Ber. C 53,33 H 3,73 N 31,10
Gef. C 53,09 H 3,68 N 31,30 +

+Herrn Wurmstich, Tübingen, danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen

6.2.3. L-Glutaminsäure-γ-benzylester (H-L-Glu(OBzl)-OH); (145,146)

Zu 500 ml wasserfreiem Diethylether fügt man unter Eiskühlung 50 ml konz. H_2SO_4 und anschließend 500 ml (4,86 mol) frisch destillierten Benzylalkohol. Nach Abziehen des Ethers am Rotationsverdampfer fügt man zur verbleibenden Mischung in kleinen Portionen 73,5 g (0,46 mol) L-Glutaminsäure. Es wird 20 h bei Raumtemperatur gerührt und dann mit 1 l wasserfreiem Ethanol verdünnt. Danach gibt man unter kräftigem Rühren 250 ml Pyridin im Tropftrichter zu. Die feinkristalline Fällung wird nach Kühlung auf 0°C abgenutscht und mit Diethylether gewaschen. Dieses Rohprodukt wird zur Entfernung geringer Mengen freier Glutaminsäure aus 950 ml siedendem Wasser, dem 10 ml Pyridin zugesetzt werden, umkristallisiert. Ausbeute 46 g (42 %); Fp. 189°C, Lit. (145) 189°C; R_F(II) = 0,46.

$C_{12}H_{15}NO_4$ (237,3) Ber. C 60,75 H 6,37 N 5,90
Gef. C 60,97 H 5,94 N 5,81

6.2.4. Darstellung der tert-Butyloxycarbonyl-aminosäurederivate; (147)

Die Darstellung der BOC-Aminosäurederivate erfolgte nach der pH-Stat-Methode von E. Schnabel in einer Dioxan-Wasser Suspension (1:1) (vgl. Tabelle 6.1).

6.2.5. tert -Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester (BOC-L-Glu(OBzl)-OH);(75,149,150)

35,6 g (0,15 mol) L-Glutaminsäure-γ-benzylester werden in 200 ml Pyridin suspendiert und nach Zugabe von 21 ml (0,15 mol) Triethylamin und 21,5 g (0,15 mol) tert -Butyloxycarbonylazid 4 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Danach werden erneut 7,2 g (0,05 mol) tert -Butyloxycarbonylazid und 5 ml (0,035 mol) Triethylamin zugegeben und 4 Tage gerührt. Schließlich werden noch 5 g (0,035

Tab. 6.1 Darstellung der tert-Butyloxycarbonyl-aminosäurederivate

Amino-säure	pH-Wert	Reakt.-zeit (h)	Umkrist.	Ausb. (%)	Fp(°C)	Lit.-Fp (°C)	R_F-Wert	Fließ-mittel	Elementaranalysen oben Ber. / unten Gef. %C	%H	%N
L-Ala	10,3	24	EE/PE 30-50°	85	80-81	79-80	0,85	I	50,78	7,99	7,40
						(147)	0,76	IV	50,59	8,11	7,24
							0,34	VII			
L-Pro	8,6	12	EE/PE 30-50°	81	135	136-137	0,84	I	55,80	7,96	6,51
						(148)	0,79	IV	56,11	8,19	6,49
							0,27	VII			
Gly	10,2	6	Methyläthyl-keton	92	92	94-95	0,78	I	47,99	7,48	8,00
						(147)	0,65	IV	47,78	7,52	8,08
							0,26	VII			
L-Gln	10,3	48	EE/PE 30-50°	40	119	116-118	0,67	I	48,77	7,37	11,38
						(147)	0,38	IV	49,07	7,58	11,36
							0,23	VII			
L-Glu(OBzl)-OH x DCHA	modifiziert nach F. Drees (siehe 4.1.5.)			66	140	139-140	0,89	I	67,15	8,94	5,40
						(75)	0,79	IV	67,42	9,04	8,39
							0,43	VII			
Aib+	11,5	48	EE/PE 30-50°	45	119	117-118	0,88	I	53,20	8,44	6,89
						(41)	0,79	IV	53,51	8,74	6,91
							0,34	VII			

+zur Ausbeuteerhöhung bei 40°C umgesetzt

mol) tert.-Butyloxycarbonylazid zugefügt und nach 12 Tagen Gesamtreaktionszeit wird aufgearbeitet. Nicht umgesetzter Glutaminsäure-γ-benzylester wird abfiltriert und zurückgewonnen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand zwischen 300 ml Essigsäureethylester und 200 ml verd. Schwefelsäure (pH = 3) verteilt. Die wässrige Phase wird mehrmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Auszüge werden dreimal mit je 100 ml Wasser sulfatfrei gewaschen. Nach Trocknung über Na_2SO_4 wird das Lösungsmittel abgezogen und 35 g tert.-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester erhalten, der nicht kristallisiert werden konnte. Das dünnschichtchromatographisch reine, farblose Öl wird in 400 ml wasserfreiem Ether aufgenommen und tropfenweise mit 13,7 ml (0,11 mol) Dicyclohexylamin (1,1 Äquivalente bezogen auf das Glutaminsäurederivat) versetzt. Es fällt weißes tert.-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester-dicyclohexylammonium-Salz aus, welches abgenutscht und nach gutem Auswaschen mit Ether über Diphosphorpentoxid am Hochvakuum getrocknet wird. Ausbeute 52,1 g (65 %); Fp. 140°C, Lit. (75) 139-140°C; R_FI = 0,89; R_FIV = 0,79; R_FVII = 0,43.

$C_{29}H_{46}N_2O_6$ (518,7) Ber. C 67,15 H 8,94 N 5,40
Gef. C 67,42 H 9,04 N 5,39

6.2.6. Methylesterderivate der Aminosäuren

6.2.6.1. α-Aminoisobuttersäuremethylester-hydrochlorid (H-Aib-OMe x HCl); (151,152)

137 g (1,33 mol) α-Aminoisobuttersäure werden in 420 ml (10,4 mol) Methanol suspendiert und im Eis/Kochsalzbad auf -10°C gekühlt. Innerhalb von 2 h werden 109 ml (1,5 mol) Thionylchlorid (ρ = 1,64 g/cm^3) unter Rühren so langsam zugetropft, daß die Temperatur nicht über -2°C ansteigt. Anschließend wird 3 h unter Rückfluß auf 50°C erwärmt. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum wird

Zur vollständigen Entfernung der HCl erneut in Methanol gelöst und wieder abgedampft. Schließlich wird aus Methanol/Ether umkristallisiert und nach Abnutschen über P_2O_5 am Hochvakuum getrocknet. Das Produkt ist dünnschichtchromatographisch einheitlich. Ausbeute 157 g (77 %); Fp. 190°C, Lit. (152) 186,5-187°C; R_FI = 0,47; R_FII = 0,36; R_FIV = 0,34.

$C_5H_{12}NO_2Cl$ (139,6) Ber. C 39,10 H 7,87 N 9,12 Cl 23,08
Gef. C 39,21 H 7,92 N 8,97 Cl 23,43

6.2.6.3. L-Glutaminmethylester-hydrochlorid(H-L-Gln-OMe x HCl); (74)

22,1 g (90 mmol) BOC-L-Gln-OH werden in 40 ml (1 mol) Methanol gelöst, mit 4 ml (55 mmol) Pyridin und einer Lösung von 2,72 g (20 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol in 20 ml Dimethylformamid versetzt. Zu dieser Lösung werden 18,54 g (90 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid gegeben und nach 48 h das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand wird in Essigsäureethylester gelöst und der Dicyclohexylharnstoff abgenutscht. Die organische Phase wird mit $KHCO_3$ (5 %), Citronensäure (5 %) und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Produkt widersteht jeglichem Kristallisationsversuch, also wird das Lösungsmittel abgezogen und das ölige BOC-L-Gln-OMe am Hochvakuum bei 40°C getrocknet. Die Ausbeute beträgt 20 g (80 %) Öl. Nach 30 minütiger Behandlung mit 200 ml 1,2n HCl/Eisessig wird direkt mit Ether gefällt. Aus Methanol/Ether erhält man weiße Nadeln. Ausbeute 9,2 g (62 %); Fp 142°C Lit. (155) 141°C; R_FI = 0,30; R_FII = 0,21; R_FIV = 0,12

$C_6H_{13}N_2O_3Cl$ (196,6) Ber. C 36,65 H 6,66 N 14,25 Cl 18,03
Gef. C 36,62 H 6,68 N 14,45 Cl 18,66

6.3. Darstellung der Peptidderivate

6.3.1. Dipeptide

6.3.1.1. tert- Butyloxycarbonyl-L-alanyl-α-aminoisobuttersäuremethylester (BOC-L-Ala-Aib-OMe); (42,58,62)

84 g (0,44 mol) BOC-L-Ala-OH werden in 400 ml Tetrahydrofuran gelöst, mit 50 ml (0,44 mol) N-Methylmorpholin versetzt und auf -20°C gekühlt. Nun fügt man langsam 57 ml (0,41 mol) Chlorameisensäureisobutylester zu, so daß die Temperatur nicht über -10°C ansteigt. Nach 15 min wird eine vorgekühlte Lösung von 61,6 g (0,40 mol) H-Aib-OMe x HCl und 46 ml (0,40 mol) N-Methylmorpholin in 250 ml Tetrahydrofuran langsam zugegeben; die Temperatur wird dabei unter -10°C gehalten. Nach 30 min bei -10°C hält man 1 h auf 0°C und rührt anschließend 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneuter Kühlung auf 0°C wird mit 150 ml ges. $KHCO_3$-Lösung das überschüssige gemischte Anhydrid innerhalb von 30 min hydrolysiert und mit 300 ml Wasser versetzt. Nach Abziehen des organischen Lösungsmittels wird die wässrige Phase fünfmal mit je 200 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Auszüge werden mit $KHCO_3$-Lösung (5 %), Citronensäurelösung (5 %) und Wasser gewaschen. Nach Trocknung über Na_2SO_4 wird ein dünnschichtchromatographisch reines Dipeptid erhalten, das jedem Kristallisationsversuch widersteht (siehe auch (42)). Daher wird das Lösungsmittel abgezogen und das gelbliche Öl bei 40°C am Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 113 g (97 %); R_FVI = 0,86; R_FVII = 0,85.

Aminosäureanalyse: Ber. Ala 1,00 Aib 1,00
Gef. Ala 1,00 Aib 0,97

6.3.1.2. L-Alanyl-α-aminoisobuttersäuremethylester-trifluoracetat (H-L-Ala-Aib-OMe x CF_3COOH)

40 g (0,14 mol) BOC-L-Ala-Aib-OMe werden in 40 ml Dichlormethan gelöst und langsam mit 250 ml (3,4 mol) Trifluoressigsäure versetzt. Nach halbstündiger Reaktion bei Raumtemperatur wird das noch gelöste Isobuten abgezogen und direkt aus der Reaktionslösung mit Ether gefällt. Umkristallisation aus Essigester/Ether gibt weiße Nadeln, die über P_2O_5 am Hochvakuum getrocknet werden. Ausbeute 37,3 g (89 %); Fp. 176°C, Lit. (42) 158-159,5°C; R_FI = 0,45; R_FII = 0,37; R_FIV = 0,28.

Aminosäureanalyse Ber. Ala 1,00 Aib 1,00
Gef. Ala 1,00 Aib 1,05

$C_{10}H_{13}N_2O_5F_3$ (302,3) Ber. C 39,74 H 5,67 N 9,27 F 19,85
Gef. C 39,56 H 5,67 N 9,11 F -

6.3.1.3. tert-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-α-aminoisobuttersäure (BOC-L-Ala-Aib-OH)

70 g (0,24 mol) BOC-L-Ala-Aib-OMe werden in 1 l Methanol gelöst und mit 375 ml (0,75 mol) 2n NaOH versetzt. Nach 2 h bei 40°C wird nach Neutralisation mit 3n HCl das Methanol abgezogen. Die wässrige Phase wird mit 3n HCl auf pH 3 eingestellt und mit Essigsäureethylester extrahiert. Danach wird die Essigesterphase dreimal mit 5 % $NaHCO_3$-Lösung extrahiert. Schließlich wird die $NaHCO_3$-Phase erneut mit 3n HCl auf pH 3 gebracht und BOC-L-Ala-Aib-OH mit Essigester ausgezogen. Nach Waschen der organischen Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und durch Zugabe von Petroläther 30-50 kristallisiert. Ausbeute 37,5 g (57 %); Fp. 178°C (Zers.); $[\alpha]_D^{25}$ = - 35,9° (c = 0,1; MeOH); R_F IV = 0,73; R_FVI = 0,67; R_FVII = 0,29.

Aminosäureanalyse Ber. Ala 1,00 Aib 1,00
Gef. Ala 1,00 Aib 0,98

$C_{12}H_{22}N_2O_5$ (274,4) Ber. C 52,54 H 8,08 N 10,21
Gef. C 52,67 H 8,35 N 10,18

6.3.1.4. tert.-Butyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-γ-benzylester-glutaminmethylester (BOC-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe)

26 g (50 mmol) BOC-L-Glu(OBzl)-OH x DCHA (≙ 17,4 g freie Säure) werden in 250 ml Essigester suspendiert und mit 500 ml 5 % Citronensäurelösung geschüttelt. Die Essigesterphase wird mit Wasser ausgewaschen und über Nacht getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man 17,3 g farbloses Öl, das in 250 ml Dimethylformamid gelöst wird. Nach Zugabe von 5,7 ml (50 mmol) N-Methylmorpholin wird auf -20°C gekühlt. Bei unter -10°C tropft man 6,2 ml (47 mmol) Chlorameisensäureisobutylester zu und rührt zur Anhydridbildung 30 min bei -15°C. Unterdessen werden 9,85 g (50 mmol) H-L-Gln-OMe x HCl in 150 ml Dimethylformamid gelöst, mit 5,7 ml (50 mmol) N-Methylmorpholin versetzt und nach Vorkühlung auf 0°C langsam zur Anhydrid-Lösung getropft, wobei die Temperatur auf -15°C gehalten wird. Nach 1 h bei dieser Temperatur rührt man noch 1 h bei 0°C und schließlich 1 h bei Raumtemperatur. Nach Eindampfen im Hochvakuum wird der Rückstand zwischen 400 ml Essigester und 400 ml Wasser verteilt. Die organische Phase wird mit 5 % $NaHCO_3$-Lösung, 5 % Citronensäurelösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und nach Einengen der Lösung mit Petroläther 30-50 gefällt. Ausbeute 22,3 g (93 %); Fp. 140-141°C; R_FI = 0,76; R_FII = 0,80; R_FV = 0,70; R_FVI = 0,78.

$C_{22}H_{33}N_3O_8$ (479,5) Ber. C 57,61 H 6,94 N 8,76
Gef. C 57,35 H 6,84 N 8,52

6.3.1.5. L-Glutaminsäure-γ-benzylester-glutaminmethylester-trifluoracetat (H-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH)

Die N-Schutzgruppe von 9,6 g (20 mmol) BOC-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe wird wie unter 6.2.1.2. beschrieben mit 40 ml (0,5 mol) Trifluoressigsäure in 16 ml Dichlormethan abgespalten. Das Trifluoracetat wird aus Methanol/Ether kristallisiert. Ausbeute 9,0 g (91 %) weiße Nadeln; Fp. 136°C; $[\alpha]_D^{25}$ = +6,4° (C = 0,1; MeOH); R_FII = 0,44; R_FIII = 0,68; R_FIV = 0,33.

$C_{20}H_{26}N_3O_8F_3$ (493,4) Ber. C 48,68 H 5,31 N 8,52 F 11,55
Gef. C 48,07 H 5,25 N 8,37 F 12,66

6.3.2. Tripeptide

6.3.2.1. tert -Butyloxycarbonyl-α-aminoisobutyryl-L-glutaminsäure-γ-benzylester-glutamin-methylester (BOC-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe)

2,56 g (12 mmol) BOC-Aib-OH werden in 30 ml Dimethylformamid gelöst und nach Zugabe von 143 ml (12,6 mmol) N-Methylmorpholin auf -15°C gekühlt. Unter Rühren werden langsam 1,15 ml (12,0 mmol) Chlorameisensäureethylester zugefügt. Nach 30 min wird bei -15°C eine vorgekühlte Lösung aus 4,14 g (8,4 mmol) H-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH und 0,95 ml (8,4 mmol) N-Methylmorpholin in 30 ml Dimethylformamid langsam zugetropft, so daß die Temperatur nicht über -10°C ansteigt. Anschließend rührt man noch 1 h bei -15°C, 1 h bei 0°C und 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneuter Kühlung auf 0°C wird mit 30 ml $KHCO_3$-Lösung (5 %) das überschüssige gemischte Anhydrid zerstört und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird zwischen 100 ml Essigester/Wasser verteilt die organische Phase mit $KHCO_3$-Lösung (5 %), Citronensäurelösung (5 %) und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Gefällt wird durch Versetzen mit Petroläther 30-50 bis zur leichten Trübung. Die Verbindung fällt in weißen Kristallen, die nach Entfernen des Lösungsmittels zähviskos werden. Ausbeute 4,4 g (93 %); Fp. 70-75°C (zerfließt); R_FI = 0,79; R_FII = 0,79; R_FIV = 0,84; R_FV = 0,70.
Aminosäureanalyse Ber. Glu 2,00 Aib 1,00
Gef. Glu 2,00 Aib 0,99
$C_{27}H_{40}N_4O_9$ (564,6) Ber. C 57,43 H 7,14 N 9,92
Gef. C 57,43 H 7,22 N 9,64

6.3.2.2. α-Aminoisobutyryl-L-glutaminsäure-γ-benzylester-glutamin-methylester-trifluoracetat (H-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH)

2,5 g (4,2 mmol) BOC-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe werden in 6 ml Dichlormethan gelöst und die N-Schutzgruppe mit 20 ml (0,27 mol) Trifluoressigsäure abgespalten wie unter 6.3.1.2. beschrieben. Nach direkter Fällung mit Ether wird aus Methanol/Ether umkristallisiert. Das dünnschichtchromatographisch reine Peptid fällt weiß aus, wird aber nach Entfernen des Lösungsmittels zähviskos. Ausbeute 2,4 g (92 %); R_FI=0,48; R_FII=0,42; R_FIII = 0,67; R_FIV = 0,30; R_F VI = 0,19.

6.3.2.3. tert -Butyloxycarbonyl-L-alanyl-α-aminoisobutyryl-alanin-methylester (BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe)

5,5 g (20 mmol) BOC-L-Ala-Aib-OH und 2,7 g (20 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst und mit 22 ml (≙ 4,5 g) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)-Lösung (C = 1 mol/l in Dichlormethan) versetzt. Nach 30 min Voraktivierung wird mit 3,5 g (25 mmol) H-L-Ala-OMe x HCl und 2,84 ml (25 mmol) N-Methylmorpholin in 20 ml Dimethylformamid versetzt und 1 h bei 35°C und 15 h bei Raumtemperatur gekuppelt. Die Reaktion wird mit wenig Eisessig abgebrochen, das Lösungsmittel am Hochvakuum abgedampft und nach Aufnehmen in Methylenchlorid der Dicyclohexylharnstoff abgenutscht. Man wäscht mit Lösungen von $NaHCO_3$ (5 %), Citronensäure (5 %)und Wasser. Nach dem Trocknen über Na_2SO_4 wird mit Petroläther 30-50 kristallisiert. Durch Kristallisation aus Dichlormethan/Methanolnach Zugabe von Petroläther 30-50 bildet das Peptid lange weiße Nadeln, die ineinander verfilzt sind. Ausbeute 5,8 g (81 %); Fp. 171°C; $[\alpha]_D^{25}$ = -32,0° (C = 0,1; MeOH); R_FI = 0,78; R_FII = 0,85; R_FV = 0,70; R_FVI = 0,78.

Aminosäureanalyse Ber. Ala 2,00 Aib 1,00
Gef. Ala 2,00 Aib 0,90

$C_{16}H_{29}N_3O_6$ (359,4) Ber. C 53,47 H 8,13 N 11,69
Gef. C 53,88 H 8,49 N 11,57

6.3.2.4. L-Alanyl-α-aminoisobutyryl-alanin-methylester-hydrochlorid (H-L-Ala-Aib-Ala-OMe x HCl)

4,0 g (11,1 mmol) BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe werden mit 40 ml 1,2n HCl/Eisessig versetzt und 30 min gerührt. Nach Abziehen des Isobuten wird direkt mit Ether gefällt und aus Methanol/Ether umkristallisiert. Ausbeute 3 g (91 %) weiße Nadeln; Fp. 240°C (Zers.); R_FI = 0,39; R_FIV = 0,26; R_FV = 0,17.

$C_{11}H_{22}N_3O_4Cl$ (295,8) Ber. C 44,67 H 7,50 N 14,21 Cl 11,99
Gef. C 43,81 H 7,26 N 13,35 Cl 11,52

6.3.2.5. tert-Butyloxycarbonyl-α-aminoisobutyryl-L-alanyl-α-aminoisobuttersäure-methylester (BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe)

6,1 g (30 mmol) BOC-Aib-OH werden in 20 ml Dimethylformamid gelöst und mit 3,4 ml (30 mmol) N-Methylmorpholin versetzt. Nach Abkühlen auf 15°C gibt man 3,81 ml (29 mmol) Chlorameisensäureisobutylester zu. Nach 30 minütiger Anhydridbildung bei -15°C tropft man eine vorgekühlte Lösung von 6,1g(20 mmol) H-L-Ala-Aib-OMe x CF_3COOH und 2,27 ml (20 mmol) N-Methylmorpholin in 50 ml Dimethylformamid zu, wobei die Temperatur unter -10°C gehalten wird. Nach 1 h bei -15°C, 1 h bei 0° und 2 h bei Raumtemperatur wird das überschüssige gemischte Anhydrid mit 50 ml $KHCO_3$-Lösung (5 %) bei 0°C zerstört und anschließend am Hochvakuum zur Trockene eingedampft. Nach Verteilen zwischen je 100 ml Essigester und Wasser wäscht man die organische Phase mit $NaHCO_3$ (5 %), Citronensäure (5 %) und Wasser. Nach Trocknung über Na_2SO_4 wird aus Essigester durch Zugabe von Petroläther 30-50 kristallisiert. Ausbeute 4,7 g (64 %) weiße Nadeln; Fp. 96°C; R_FI = 0,80; R_FII = 0,86; R_FV = 0,73.

Aminosäureanalyse Ber. Ala 1,00 Aib 2,00
Gef. Ala 1,00 Aib 1,95

$C_{17}H_{31}N_3O_6$ (373,5) Ber. C 54,68 H 8,37 N 11,25
Gef. C 54,87 H 8,69 N 10,96

6.3.2.6. tert -Butyloxycarbonyl-α-aminoisobutyryl-L-alanyl-α-aminoisobuttersäure (BOC-Aib-L-Ala-Aib-OH)

2,5 g (6,7 mmol) BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe werden in 50 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 20 ml 1n NaOH 2 h bei 40°C verseift. Nach Ansäuern mit Citronensäure auf pH 4 wird zur Trockene eingedampft, der Rückstand zwischen 50 ml Essigester/1-Butanol (1:1) und 50 ml Wasser verteilt und die organische Phase dreimal mit $NaHCO_3$-Lösung (5 %) extrahiert. Die $NaHCO_3$-Lösung wird nun erneut mit Citronensäure auf pH 4 gebracht und mit Essigester/1-Butanol (5:1) ausgeschüttelt und nach Trocknung über Na_2SO_4 mit Petroläther 30-50 gefällt. Ausbeute 1,5 g (63 %); Fp. 153-154°C; $[\alpha]_D^{25} = -18,6^\circ$ (C = 0,1; MeOH); R_FI = 0,76; R_FII = 0,81; R_FV = 0,32; R_FVII = 0,27.

$C_{16}H_{29}N_3O_6$ (359,5) Ber. C 53,47 H 8,13 N 11,69
Gef. C 52,92 H 8,55 N 11,61

Durch Edman-Abbau an fester Phase (vgl. Abschnitt 2.2.3.2.) ergibt sich die Sequenz Aib-Ala-Aib.

Der Edman-Abbau wurde am Edman-Sequenator von Herrn Dr. E. Wachter (71,72), München, durchgeführt. Die Peptide mit freier Carboxylgruppe werden durch HOBt/DCC-Kupplung (65) an die feste Phase 3-Amino-propyl-glas gebunden, dagegen erfolgt die Verknüpfung von Peptidhydraziden über Diisothiocyanat. Bei Verwendung von Peptidhydraziden zum Edman-Abbau kann jedoch die C-terminale Aminosäure nicht bestimmt werden. Die N-terminalen Aminosäuren werden jeweils als Phenylthiohydantoine mit Trifluoressigsäure abgaspalten und gaschromatographisch (Shimatsu GC-6-A FDP) bzw. massenspektroskopisch (Quadrupol Massenspektrometer Finnigan 3200) bestimmt. Charakteristisch für Alanin ist die Massenzahl $^m/e = 206$, für α-Aminoisobuttersäure $^m/e = 220$ (vgl. Abb. 2.4).

Die Kinetik der Verseifungsgeschwindigkeit der beiden Peptide BOC-Aib-L-Ala-Aib-OMe bzw. BOC-L-Ala-Aib-Ala-OMe (vgl. Abschnitt 2.2.3.1. Abb. 2.3) wird wie folgt durchgeführt. Von jedem Peptid werden 30 µmol (1 mg) in 1 ml Methanol gelöst und auf 23°C temperiert. 300 µl 0,1n NaOH werden

zugegeben, nach 1, 5, 15, 30 min, 1, 2, 15 h jeweils 2 µl Probe gezogen und auf eine Kieselgelfertigplatte aufgetragen. Die Startflecken werden vorher mit Citronensäure imprägniert um eine Weiterreaktion auszuschließen. Nach Chromatographie mit Fließmittel V wird ein Vergleich der Farbintensität der Dünnschichtflecken (Chlor/TDM-Sprühreagenz) durchgeführt.

6.3.2.7. tert - Butyloxycarbonyl-L-prolyl-alanyl-α-amino-isobuttersäure-methylester (BOC-L-Pro-Ala-Aib-OMe)

6,5 g (30 mmol) BOC-L-Pro-OH und 3,4 ml (30 mmol) N-Methylmorpholin werden in 50 ml Dimethylformamid gelöst und nach halbstündiger Anhydridbildung mit 3,74 ml (28,5 mmol) Chlorameisensäureisobutylester bei -15°C mit einer vorgekühlten Lösung von 6,1 g (20 mmol) H-L-Ala-Aib-OMe x CF_3COOH und 2,28 ml (20 mmol) N-Methylmorpholin in 50 ml Dimethylformamid versetzt. Die Temperatur wird dabei unter -10°C gehalten; danach wird noch 1 h bei -15°C, 1 h bei 0°C und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zerstörung des überschüssigen gemischten Anhydrids mit 50 ml $KHCO_3$-Lösung (5 %) bei 0°C wird die Lösung am Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen und nach Waschen mit $NaHCO_3$ (5 %), Citronensäure (5 %) und Wasser über Na_2SO_4 getrocknet. Das Peptid widersetzt sich allen Kristallisationsversuchen, es kann aus Essigester mit Petroläther 30-50 nur als Öl gefällt werden, das nach der Trocknung über P_2O_5 am Hochvakuum glasartig erstarrt. Ausbeute 5,2 g (68 %); Fp. 109-111°C; R_FI = 0,80; R_FII = 0,87; R_FIV = 0,92; R_FV = 0,79.

Aminosäureanalyse Ber. Ala 1,00 Aib 1,00 Pro 1,00
Gef. Ala 1,00 Aib 0,97 Pro 1,02

$C_{18}H_{31}N_3O_6$ (385,5) Ber. C 56,09 H 8,11 N 10,90
Gef. C 55,48 H 8,35 N 10,57

6.3.2.8. tert -Butyloxycarbonyl-L-prolyl-alanyl-α-amino-isobuttersäure (BOC-L-Pro-Ala-Aib-OH)

3,4 g (8,8 mmol) BOC-L-Pro-Ala-Aib-OMe werden in 100 ml Methanol gelöst, mit 25 ml 1n NaOH versetzt und 3 h bei 35°C gerührt. Danach wird mit Citronensäure auf pH 4 angesäuert, das Methanol abgezogen und mit Essigester extrahiert. Zur weiteren Aufreinigung wird die Essigesterphase mit $NaHCO_3$ (5 %) extrahiert und die wässrige Phase nach Ansäuern mit Citronensäure auf pH 4 erneut mit Essigester extrahiert. Nach Trocknen der Essigesterlösung über Na_2SO_4 fällt BOC-L-Pro-Ala-Aib-OH nach Zugabe von Petroläther 30-50 weiß kristallin. Ausbeute 1,3 g (40 %); Fp. 192-193°C; $[\alpha]_D^{25}$ = -85,5°(C = 0,1; MeOH); R_FI = 0,76; R_FII = 0,80; R_FIV = 0,75; R_FVI = 0,61; R_FVI = 0,27.

$C_{17}H_{29}N_3O_6$ (371,5) Ber. C 54,97 H 7,87 N 11,31
Gef. C 55,07 H 7,70 N 11,17

6.3.2.9. tert -Butyloxycarbonyl-glycyl-L-alanyl-α-amino-isobuttersäure-methylester (BOC-Gly-L-Ala-Aib-OMe)

1,05 g (6 mmol) BOC-Gly-OH und 1,62 g (12 mmol) HOBt werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst, mit 6,8 ml (≙ 1,4 g) DCC-Stammlösung (C = 1 mol/l in Dichlormethan) versetzt und nach halbstündiger Voraktivierung mit einer Lösung von 1,21 g (4 mmol) H-L-Ala-Aib-OMe x CF_3COOH und 454 µl (4 mmol) N-Methylmorpholin in 30 ml Dimethylformamid 15 h bei Raumtemperatur vereinigt. Nach Zugabe von wenig Eisessig wird am Hochvakuum eingeengt und der Rückstand zwischen 30 ml Essigester/1-Butanol (1:1) und 30 ml $NaHCO_3$ (5 %) verteilt. Die organische Phase wird mit $NaHCO_3$ (5 %), Citronensäure (5 %) und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Da das Peptid noch geringe Mengen an Dicyclohexylharnstoff aufweist wird fünfmal zwischen den Phasen des Systems Petroläther 30-50/Essigester/Methanol/Wasser (4:7:4:7) verteilt. Hierbei reichert

sich der Harnstoff in der Oberphase, das Peptid in der Unterphase an. Nach Eindampfen des Lösungsmittels kristallisiert das Peptid aus Essigester mit Petroläther 30-50 in Form von leicht verfilzten weißen Nadeln. Ausbeute 0,7 g (50 %); Fp. 109°C ; $[\alpha]_D^{25} = -33,5^\circ$ (C = 0,1; MeOH); R_FI = 0,80; R_FII = 0,86; R_FIV = 0,83; R_FV = 0,71.

Aminosäureanalyse Ber. Ala 1,00 Aib 1,00 Gly 1,00
Gef. Ala 1,03 Aib 0,99 Gly 1,00

$C_{15}H_{27}N_3O_6$ (345,0) Ber. C 52,16 H 7,88 N 12,17
Gef. C 51,60 H 7,84 N 11,92

6,3.2.10. tert -Butyloxycarbonyl-glycyl-L-alanyl-α-amino-isobuttersäure (BOC-Gly-L-Ala-Aib-OH)

0,5 g (1,6 mmol) BOC-Gly-L-Ala-Aib-OMe werden in 25 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 6 ml 1 n NaOH 2 h bei 35°C gerührt. Danach wird mit Citronensäure auf pH 4 eingestellt und mit Essigester/1-Butanol (1:1) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird nun dreimal mit $NaHCO_3$-Lösung (5 %) extrahiert. Nach Ansäuern der Hydrogencarbonat-Lösung mit Citronensäure auf pH 4 wird wieder mit Essigester/1-Butanol (1:1) ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Peptidsäure wird aus Essigester/1-Butanol (5:1) mit Petroläther 30-50 kristallisiert. Ausbeute 0,3 g (63 %); Fp. 111°C; R_FI = 0,77; R_FIV = 0,66; R_FV = 0,25; R_FVII = 0,26.

$C_{14}H_{25}N_3O_4$ (331,4) Ber. C 50,74 H 7,60 N 12,68
Gef. C 50,22 H 8,12 N 11,71

6.3.3. Längere Peptide

6.3.3.1. tert-Butyloxycarbonyl-L-alanyl-α-aminoisobutyryl-alanyl-α-aminoisobutyryl-alanin-methylester (BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OMe)

1,65 g (6,0 mmol) BOC-L-Ala-Aib-OH und 1,62 g (12 mmol) HOBt werden in 20 ml Dimethylformamid gelöst, mit 6,5 ml (≙ 1,34 g) DCC-Stammlösung versetzt und 30 min bei 35°C voraktiviert. Nun wird eine Lösung von 1,48 g (5,0 mmol) H-L-Ala-Aib-Ala-OMe x HCl und 567 µl (5,0 mmol) N-Methylmorpholin in 60 ml Dimethylformamid zugegeben, 1 h bei 35°C und 15 h bei Raumtemperatur gerührt und danach die Reaktion mit wenig Eisessig abgebrochen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels am Hochvakuum wird in Essigester/1-Butanol (8:1) aufgenommen und Dicyclohexylharnstoff abgenutscht. Die Lösung wird mit $NaHCO_3$ (5 %), Citronensäure (5 %) und Wasser gewaschen und nach Trocknen über Na_2SO_4 mit Petroläther 30-50 kristallisiert. Ausbeute 1,6 g (62 %); Fp. 176°C; $[\alpha]_D^{25}$ = -25,2° (C = 0,1; MeOH); R_FI = 0,74; R_FII = 0,80; R_FIV = 0,81; R_FV = 0,67

Aminosäureanalyse Ber. Ala 3,00 Aib 2,00
Gef. Ala 3,00 Aib 2,06

$C_{23}H_{41}O_8N_5$ (515,6) Ber. C 53,58 H 8,02 N 13,58
Gef. C 53,89 H 8,24 N 13,44

Nach Methylesterverseifung mit 3 Äquivalenten 1n NaOH wird die Verbindung durch Edman-Abbau (vgl. Abschnitt 2.2.3.1.) analysiert und ergibt die erwartete Sequenz Ala-Aib-Ala-Aib-Ala.

6.3.3.2. L-Alanyl-α-aminoisobutyryl-alanyl-α-aminoisobutyryl-alanin-methylester-hydrochlorid (H-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OMe x HCl)

Die tert.-Butyloxycarbonylschutzgruppe von 1,15 g (2,2 mmol) BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OMe wird mit 12 ml 1,2n HCl/Eisessig innerhalb 30 min abgespalten. Das Peptid wird direkt mit Ether gefällt und aus Methanol/Ether umkristallisiert. Ausbeute 0,95 g (97 %); Fp. 175°C; R_FI = 0,38; R_FIII = 0,64; R_FIV = 0,26; R_FV = 0,18.

$C_{18}H_{44}N_5O_6Cl$ (452,0) Ber. C 47,83 H 7,58 N 15,49 Cl 7,85
Gef. C 46,71 H 7,68 N 14,79 Cl 7,43

6.3.3.3. tert -Butyloxycarbonyl-α-aminoisobutyryl-L-alanyl-α-aminoisobutyryl-alanyl-α-aminoisobuttersäure-methylester (BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OMe

1,08 g (3 mmol) BOC-Aib-L-Ala-Aib-OH, 0,81 g (6 mmol) HOBt und 3,3 ml (≙ 0,68 g) DCC-Lösung (C = 1 mol/l in Dichlormethan) werden wie unter 6.3.3.1. beschrieben mit 0,91 g (3 mmol) H-L-Ala-Aib-OMe x CF_3COOH und 342 µl (3 mmol) N-Methylmorpholin in Dimethylformamid gekuppelt. Nach Zugabe von wenig Eisessig wird die Hauptmenge Dicylohexylharnstoff abgetrennt und nach Abziehen des Lösungsmittels am Hochvakuum wird der Rückstand in 50 ml Essigester gelöst. Beim Durchschütteln mit 50 ml $NaHCO_3$ (5 %) fällt das Peptid, evtl. durch Sättigung der organischen Phase mit Wasser, als weißer Niederschlag, der aus Dichlormethan/Petroläther 30-50 in Form von weißen Nadeln kristallisiert. Ausbeute 1,2 g (80 %); Fp. 174°C; R_F I = 0,79; R_FII = 0,80; R_FIV = 0,82; R_FV = 0,69.

Aminosäureanalyse Ber. Ala 2,00 Aib 3,00
Gef. Ala 2,00 Aib 2,94

$C_{24}H_{43}O_8N_5$ (529,6) Ber. C 54,43 H 8,18 N 13,22
Gef. C 53,73 H 8,80 N 12,59

6.3.3.4. tert -Butyloxycarbonyl-α-aminoisobutyryl-L-alanyl-α-aminoisobutyryl-alanyl-α-aminoisobuttersäure (BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OH)

1,07 g (2 mmol) BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OMe werden in 15 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 6 ml 1n NaOH 2 h bei 35°C gerührt. Nach Neutralisation mit Citronensäure und Abziehen des Lösungsmittels wird zwischen 50 ml Essigester und 50 ml $NaHCO_3$ (5 %) verteilt und die Hydrogencarbonatphase nach Ansäuern mit Citronensäure auf pH 4, mit Essigester/1-Butanol (5:1) fünfmal extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 fällt das Peptid mit Petroläther 30-50 als gallertartiger Niederschlag aus. Ausbeute 0,70 g (68 %) Fp. 225°C; R_FI = 0,75; R_FII = 0,77; R_FIV = 0,71; R_FVII = 0,21.

$C_{23}H_{41}O_8N_5$ (515,6) Ber. C 53,58 H 8,02 N 13,58
Gef. C 53,77 H 8,31 N 13,63

Der Edman-Abbau an fester Phase (vgl. 2.2.3.1.) ergibt die richtige Sequenz Aib-Ala-Aib-Ala-Aib.

6.3.3.5. tert -Butyloxycarbonyl-L-prolyl-alanyl-α-aminoisobutyryl-α-aminoisobutyryl-glutaminsäure-γ-benzylester-glutamin-methylester (BOC-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe)

818 mg (2,2 mmol) BOC-L-Pro-Ala-Aib-OH und 594 mg (4,4 mmol) HOBt werden in 10 ml Dimethylformamid gelöst und mit 2,4 ml (≙ 495 mg) DCC-Stammlösung (C = 1 mol/l in Dichlormethan) versetzt. Nach 30 min bei 35°C wird mit 1,0 g (1,7 mmol) H-Aib-L-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH und 194 µl (1,7 mmol) N-Methylmorpholin in 10 ml Dimethylformamid versetzt. Nach 5 h Reaktion bei 35°C werden nochmals 0,25 Äquivalent an voraktivierter Carboxylkomponente zugegeben [205 mg (0,55 mmol) BOC-L-Pro-Ala-Aib-OH; 149 mg (1,1 mmol HOBt; 0,6 ml (≙ 124 mg) DCC-Stammlösung (C = 1 mol/l) in 5 ml DMF]. Es wird 15 h bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wenig Eisessig

zugegeben und am Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, mit $NaHCO_3$ (5 %), Citronensäure (5 %) und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und mit Petroläther 30-50 gefällt. Das gelbgefärbte Rohprodukt (550 mg) enthält noch Verunreinigungen und wird durch 135-stufige Craig-Verteilung in einer (3+3) ml-Apparatur (Firma Labortec,Münchenstein, Schweiz) gereinigt. Als quarternäres Lösungsmittelsystem wird Essigester/Petroläther 30-50/Methanol/Wasser (2:3:2:3) verwendet. Je Verteilung werden maximal 200 mg Peptid auf 3 Elemente verteilt eingegeben. Die Verteilung (35 Schüttelbewegungen, 3 min Trennzeit) wird dünnschichtchromatographisch verfolgt und zeigt Substanzmaxima r_{max} in den aufgeführten Elementen. Der Nernst'sche Verteilungskoeffizient $K = c_o/c_u$ läßt sich aus r_{max} berechnen.

Hexapeptid	$R_F V = 0,64$;	$r_{max} = 17$;	$K = 0,15$
Nebenprodukt 1	$R_F V = 0,56$;	$r_{max} = 6$;	$K = 0,05$
Nebenprodukt 2	$R_F V = 0,31$;	$r_{max} = 22$;	$K = 0,20$
Dicyclohexylharnstoff	$R_F V = 0,83$;	$r_{max} = 125$;	$K = 12,0$

Weitere Verunreinigungen mit R_F V = 0,17 und R_F V = 0,02 bleiben in den Startelementen zurück, zeigen also K = 0. Es werden die Elemente 14-26 aufgearbeitet und 80 mg Hexapeptid mit Nebenprodukt 2 erhalten. Fraktion 8-13 ergibt 50 mg Nebenprodukt 1 mit Hexapeptid und Fraktion 5-7 20 mg Nebenprodukt 1 leicht verunreinigt. Auf diese Weise werden mit insgesamt drei Craig-Verteilungen 240 mg Hexapeptid erhalten; die Fraktionen 8-13, die das Hexapeptid mit Nebenprodukt 1 enthalten, werden ein zweites Mal mitgetrennt. Das Hexapeptid ist noch mit Nebenprodukt 2 verunreinigt. Die Trennung von diesem Peptid erfolgt durch Chromatographie über eine Kieselgel-60-Säule (vgl. Abschnitt 6.1.) mit Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) als Elutionsmittel. Umkristallisation aus Essigester/Petroläther 30-50 führt zu einem dünnschichtreinen Hexapeptid. Ausbeute 200 mg (15 %); Fp. 108-110°C; R_FI = 0,72; R_FIV = 0,79; R_FV = 0,64; R_FVI = 0,85.

Aminosäureanalyse Ber. Aib 2,00 Ala 1,00 Glu 2,00 Pro 1,00
Gef. Aib 1,88 Ala 1,00 Glu 2,20 Pro 0,94
$C_{39}H_{59}N_7O_{12}$ (818,0) Ber. C 57,27 H 7,27 N 11,98
Gef. C 56,30 H 6,81 N 11,27

6.3.3.6. L-Prolyl-alanyl-α-aminoisobutyryl-α-aminoisobutyryl-glutaminsäure-γ-benzylester-glutamin-methylester-trifluoracetat (H-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH)

140 mg (0,171 mmol) H-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe werden in 0,4 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 1 ml (13,4 mmol) Trifluoressigsäure 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abziehen des Isobutens am Wasserstrahlvakuum wird mit Ether gefällt und aus Methanol/Ether umkristallisiert. Die Substanz fällt weiß kristallin, jedoch beim Abnutschen zähviskos, so daß eine Isolierung aus der Mutterlauge durch Zentrifugieren vorgezogen wird. Ausbeute 110 mg (77 %); R_FI = 0,37; R_FII = 0,32; R_FIII = 0,60; R_FIV = 0,17; R_FV = 0,18.

6.3.3.7. tert -Butyloxycarbonyl-glycyl-L-alanyl-α-aminoisobutyryl-prolyl-alanyl-α-aminoisobutyryl-α-aminoisobutyryl-glutaminsäure-γ-benzylester-glutamin-methylester (BOC-Gly-L-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe)

59,5 mg (198 µmol) BOC-Gly-L-Ala-Aib-OH und 53,6 mg (397 µmol) HOBt werden in 5 ml Dimethylformamid gelöst, mit 0,21 ml (≙ 43,3 mg) DCC-Lösung (1 mol/l in Dichlormethan) versetzt und 30 min bei 30°C voraktiviert. Danach fügt man eine Lösung von 110 mg (132 µmol) H-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH und 15 µl (132 µmol) N-Methylmorpholin in 5 ml Dimethylformamid zu. Nach 12 h bei 30°C wird mit 0,25 Äquivalent aktivierter Carboxylkomponente [9 mg (30 µmol) BOC-Gly-Ala-Aib-OH; 8 mg HOBt (60 µmol); 35 µl 1m DCC-Lösung (35 µmol)] 24 h nachgekuppelt.

Nach Abbruch der Reaktion mit wenig Eisessig wird das Lösungsmittel am Hochvakuum abgezogen, der Rückstand in 20 ml Essigester/1-Butanol (1:1) gelöst und mit $NaHCO_3$ (5 %); Citronensäure (5 %) und Wasser ausgewaschen. Dem Trocknen über Na_2SO_4 folgt Kristallisation aus Essigester/1-Butanol (5:1) mit Petroläther 30-50. Ausbeute 71 mg (55 %); Fp. 125 °C; R_FI = 0,79; R_FII = 0,63; R_FIV = 0,76; R_FV = 0,63

Aminosäureanalyse

Ber. Aib 3,00 Ala 2,00 Gly 1,00 Pro 1,00 Glu 2,00
Gef. Aib 2,90 Ala 2,00 Gly 1,04 Pro 0,93 Glu 2,12

6.3.3.8. Glycyl-L-alanyl-α-aminoisobutyryl-prolyl-alanyl-α-aminoisobutyryl-α-aminoisobutyryl-glutaminsäure-γ-benzylester-glutamin-methylester-trifluoracetat (H-Gly-L-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH)

Die Aminoschutzgruppe von 65 mg (63 µmol) BOC-Gly-L-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe wird wie unter 6.3.1.2. beschrieben mit 0,2 ml Dichlormethan und 0,5 ml (6,7 mmol) Trifluoressigsäure abgespalten und das Nonapeptid aus Methanol/Ether kristallisiert. Die 60 mg Nonapeptidester (92 %) sind dünnschichtchromatographisch rein und werden zur Synthese des Nonadekapeptids eingesetzt. R_FI = 0,34; R_FIII = 0,61; R_FIV = 0,22; R_FV = 0,17; R_FVI = 0,17.

6.3.3.9. tert-Butyloxycarbonyl-(α-aminoisobutyryl-L-alanyl)$_4$-α-aminoisobutyryl-alanin-methylester (BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OMe)

516 mg (1 mmol) BOC-Aib-(L-Ala-Aib)$_2$-OH und 270,2 mg (2 mmol) HOBt werden in 5 ml Dimethylformamid gelöst, mit 1,1 ml (≙ 227 mg) DCC-Lösung (C = 1 mol/l in Dichlormethan) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur voraktiviert. Danach wird mit einer Lösung von 452 mg (1 mmol) H-L-Ala-(Aib-Ala)$_2$-OMe x HCl und 114 µl (1 mmol) N-Methylmorpholin

in 10 ml Dimethylformamid versetzt. Nach 4 h bei 35°C und 20 h bei Raumtemperatur wird mit einigen Tropfen Eisessig versetzt. Das Lösungsmittel wird am Hochvakuum abgezogen und der Rückstand in Essigester/1-Butanol (1:1) gelöst. Nach Abnutschen des Dicyclohexylharnstoffs wird mit $NaHCO_3$ (5 %), Citronensäure (5 %) und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und mit Petroläther 30-50 kristallisiert. Durch Kristallisation aus Dichlormethan/Methanol mit Ether erhält man die in Abb. 2.7,a gezeigten Nadeln. Ausbeute 730 mg (80 %); Fp. 215°C (Zers.); R_FI = 0,78; R_FII = 0,82; R_FIV = 0,77; R_FV = 0,65.

Aminosäureanalyse Ber. Ala 5,00 Aib 5,00
Gef. Ala 5,00 Aib 5,06

$C_{41}H_{72}N_{10}O_{13}$ (913,1) Ber. C 53,93 H 7,95 N 15,34
Gef. C 54,00 H 7,87 N 14,89

6.3.3.10 tert -Butyloxycarbonyl-(α-aminoisobutyryl-L-alanyl)$_4$-α-aminoisobutyryl-alanin (BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH)

457 mg (0,5 mmol) BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OMe werden in 10 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 3 ml (1,5 mmol) 0,5n NaOH 2 h bei Raumtemperatur verseift. Nach Neutralisation mit Citronensäure wird das Methanol verdampft und der Rückstand zwischen 50 ml $NaHCO_3$ (5 %) und 50 ml Essigester verteilt. Die wässrige Phase wird nach Ansäuern mit Citronensäure auf pH 4 dreimal mit Essigester/1-Butanol (1:1) extrahiert. Nach Waschen der organischen Phase und Trocknen über Na_2SO_4 wird mit Petroläther 30-50 gefällt. BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH kristallisiert aus Chloroform/Methanol (2:1) mit Petroläther 30-50 in Form von Nadelbüscheln (vgl. Abb. 2.7,b), dagegen aus Dichlormethan/Methanol mit Ether als durchsichtige Tafeln (Abb. 2.7,c). Ausbeute 370 mg (82 %); Fp. 235°C; R_FI = 0,75; R_FIV = 0,70; R_FV = 0,34; R_FVI = 0,61; R_FVII = 0,21.

$C_{40}H_{70}N_{10}O_{13}$ (899,1) Ber. C 53,44 H 7,85 N 15,58
Gef. C 53,22 H 7,64 N 16,29

Die Verbindung wird durch Edman-Abbau an fester Phase analysiert (vgl. 2.2.3.1) und ergibt die Sequenz Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala.

6.3.3.11. tert -Butyloxycarbonyl-(α-aminoisobutyryl-L-alanyl)$_4$-α-aminoisobutyryl-alanin-Caesium (BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-O$^-$Cs$^+$

9 mg (10 µmol) BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH werden in 1 ml Wasser suspendiert und langsam mit 100 µl 0,1n Cs_2CO_3-Lösung versetzt; dabei geht das Dekapeptid durch Bildung des Caesiumsalzes in Lösung (76). Nach 2 stündiger Reaktion bei Raumtemperatur wird abgenutscht und zur Trockene eingedampft. Aus Methanol/Dichlormethan (1:1) kristallisiert das Caesiumsalz des Dekapeptids in Form farbloser Säulen (vgl. Abb. 2.7,d). Ausbeute 9 mg (87 %)

Aminosäureanalyse Ber. Ala 5,00 Aib 5,00
Gef. Ala 5,00 Aib 4,90

$C_{40}H_{69}N_{10}O_{13}Cs$ (1031,0) Ber. C 46,60 H 6,74 N 13,59 Cs 12,89
Gef. C 46,45 H 6,73 N 13,16 Cs —

6.3.3.12. tert -Butyloxycarbonyl-(α-aminoisobutyryl-L-alanyl)$_5$-prolyl-alanyl-α-aminoisobutyryl-α-aminoisobutyryl-glutaminsäure-γ-benzylester-glutaminmethylester (BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe)

9 mg (10 µmol) BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH und 2,7 mg (20 µmol) HOBt werden in 0,5 ml Dimethylformamid gelöst, auf 0°C gekühlt und nach Zugabe von 12 µl (≙ 2,5 mg) DCC-Lösung (C =1mol/l in Dichlormethan) 30 min bei Raumtemperatur voraktiviert. Anschließend fügt man eine Lösung von 7,5 mg (10 µmol) H-L-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH und 1,13 µl (10 µmol) N-Methylmorpholin in 0,5 ml Dimethylformamid zu und rührt 12 h bei 35°C. Mit wenig Eisessig wird die Reaktion abgebrochen, das Lösungsmittel bei 40°C am Hochvakuum abgezogen und der Rückstand nach Lösen in

Methylenchlorid und Abnutschen des Dicyclohexylharnstoffs mit $NaHCO_3$ (5 %), Citronensäure (5 %) und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird mit aliquoter Menge Methanol versetzt und mit Petroläther 30-50 ausgefällt. Da das Peptid noch geringe Spuren Verunreinigungen enthält, wird es durch präparative Dünnschichtchromatographie auf einer Kieselgel-Fertigplatte (60 F_{254} von Merck) mit Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4) als Fließmittel gereinigt. Das lipophile Peptid wird auf der Kieselgelschicht durch Ansprühen mit Wasser sichtbar gemacht und diese Stelle mit Ethanol eluiert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wird in Methanol/Dichlormethan(1:1) aufgenommen und mit Petroläther 30-50 gefällt. Ausbeute 3 mg (20 %); R_FIV = 0,79; R_FV = 0,65.

Aminosäureanalyse Ber. Aib 7,00 Ala 6,00 Pro 1,00 Glu 2,00
Gef. Aib 7,00 Ala 5,90 Pro 1,02 Glu 2,23

6.3.3.13. tert -Butyloxycarbonyl-(α-aminoisobutyryl-L-alanyl)$_5$-glycyl-alanyl-α-aminoisobutyryl-prolyl-alanyl-α-aminoisobutyryl-α-aminoisobutyryl-glutaminsäure-γ-benzylester-glutamin-methylester (BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe)

77,5 mg (86 µmol) BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-OH und 23,3 mg (172,5 µmol) HOBt werden in 0,5 ml Dimethylformamid gelöst, auf 0°C gekühlt, mit 92 µl (≙ 184 mg) DCC-Lösung (C = 1 mol/l in Dichlormethan) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur voraktiviert. Danach wird eine Lösung von 60 mg (57,5 µmol) H-Gly-L-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe x CF_3COOH und 6,5 µl (57,5 µmol) N-Methylmorpholin (97 %) in 0,5 ml Dimethylformamid zugegeben und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird mit wenig Eisessig abgebrochen, das Lösungsmittel am Hochvakuum abgezogen und der Rückstand nach Lösen in 10 ml Essigester/1-Butanol (1:1) mit $NaHCO_3$ (5 %), Citronensäure (5 %) und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird das

Lösungsmittel ganz abgedampft und aus Essigester mit Petroläther 30-50 umkristallisiert. Es werden 50 mg weißes Produkt erhalten, das nach dünnschichtchromatographischen Untersuchungen neben wenig Dicyclohexylharnstoff (R_FV = 0,83) aus zwei Ninhydrin-negativen, Chlor/TDM-positiven Peptiden bestand, von denen eines im UV absorbiert (R_F = 0,65) und das andere nicht (R_FV = 0,56). Die Peptide können mit einer Craig-Verteilung über 135 Stufen in einer (3+3) ml Apparatur (vgl. 6.3.3.5) getrennt werden. Als Lösungsmittelsystem wird Essigester/Petroläther 30-50/Methanol/Wasser (1:2:1:2) verwendet und 50 mg Peptidgemisch auf zwei Elemente verteilt eingesetzt. Die Verteilung wird dünnschichtchromatographisch verfolgt (Abb. 6.1) und zeigt folgende Substanzmaxima r_{max}.

R_FV = 0,56; r_{max} = 32; K = 0,31; 8 mg
R_FV = 0,65; r_{max} = 75; K = 1,25;35 mg
R_FV = 0,83; r_{max} =123; K 9,88 ; -

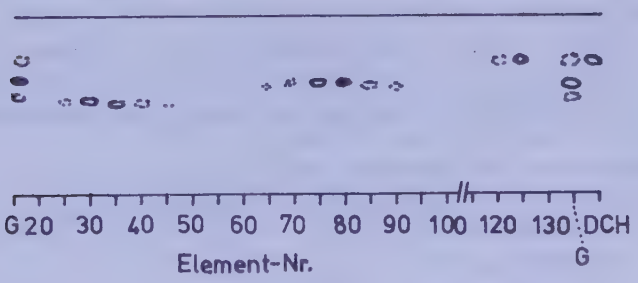


Abb. 6.1 Dünnschichtchromatogramm der Craig-Verteilung der Reaktionsprodukte des Nonadekapeptids, aufgetragen auf Kieselgel-Fertigplatte (60 F_{254}, Merck), Laufmittel V ($CHCl_3$/Methanol/H_2O 65:25:4)
(G) = in die Craig-Verteilung eingebrachtes Peptidgemisch
DCH = Dicyclohexylharnstoff

Das Nonadekapeptid ist in den Elementen 65-95 enthalten (vgl. 6.3.3.5.). Es wird aus Essigester/1-Butanol (5:1)

mit Petroläther 30-50 gefällt und über P_2O_5 am Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 35 mg (34 %); Fp. 158°C; R_FI = 0,78; R_FIV = 0,78; R_FV = 0,65; R_FVI = 0,80.

Aminosäureanalyse

Ber. Aib 8,00 Ala 7,00 Gly 1,00 Pro 1,00 Glu 2,00
Gef. Aib 7,95 Ala 7,18 Gly 1,00 Pro 1,05 Glu 1,96

Racemattest (vgl. Abschnitt 2.2.5.)

Zur Trennung der enantiomeren Aminosäuren des Totalhydrolysats (vgl. 6.1.) von 0,2 mg Nonadekapeptid Ia wird im verschlossenen Gefäß mit 200 µl 2n HCl/Isopropanol 1 h bei 110°C verestert. Nach Abblasen unter Stickstoff wird mit 50 µl Pentafluorpropionsäureanhydrid in 250 µl Dichlormethan 1 h bei Raumtemperatur acyliert. Nach erneutem Abblasen mit Stickstoff werden die N-Pentafluorpropionyl-aminosäure-isopropylester in 50 µl Dichlormethan gelöst.

Die absolute Konfiguration der Aminosäuren wird durch Gas-Flüssig-Chromatographie in einer 20m x 0,3mm großen Glaskapillarsäule bestimmt, die mit N-Propionyl-L-valintert -butylamid-polysiloxan beschichtet ist. Als Gaschromatograph wird ein Carlo Erba Modell 2101 mit Wasserstoff als Trägergas verwendet. (Detektor: FID; Temperaturprogramm: 2 min 87°C, dann 4°C/min bis 200°C).

Als Ergebnis des Racemattests erhält man für das Nonadekapeptid (Ia) folgenden Anteil an D-Aminosäuren.

D-Ala 3,2 %
D-Pro 3,0 %
D-Glu 3,7 %

Die Durchführung von Hydrolyse und Derivatisierung an reinen L-Aminosäuren (57) ergibt folgende Ergebnisse

D-Ala 1,7 %
D-Glu 3,7 %
D-Pro 3,9 %

Es läßt sich somit feststellen, daß die durch Synthesebedingungen verursachte Racemisierung für Glutaminsäure und Prolin vernachlässigbar klein ist, und für Alanin unter 2 % liegt.

6.3.3.14. tert-Butyloxycarbonyl-(α-aminoisobutyryl-L-alanyl)$_5$-glycyl-alanyl-α-aminoisobutyryl-propyl-alanyl-α-aminoisobutyryl-α-aminoisobutyryl-glutaminsäure-glutamin-methylester (BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OH)-Gln-OMe)

3,6 mg (2 μmol) BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe werden in 1 ml Methanol/1-Butanol (4:1) gelöst, mit einer Spatelspitze Palladium-Kohle-Katalysator versetzt. Nach Zugabe von 5 μl Eisessig wird 10 min Wasserstoff eingeleitet und 30 min unter Luftabschluß gerührt. Nach Abzentrifugieren des Katalysators wird das Lösungsmittel abgezogen und die Nonadekapeptidsäure (Ib) aus Essigester mit Petroläther 30-50 umkristallisiert. Ausbeute 3 mg (88 %); R_FI = 0,76; R_FIV = 0,74; R_FV = 0,59; R_FVII = 0,19.

Aminosäureanalyse

Ber. Aib 8,00 Ala 7,00 Gly 1,00 Pro 1,00 Glu 2,00

Gef. Aib 7,68 Ala 6,95 Gly 1,00 Pro 1,12 Glu 2,00

Ein durchgeführter Edman-Abbau konnte infolge zu starker Intensitätsabnahme der Massenzahlen nur bis Position 10 verfolgt werden, ergab aber bis dahin die richtige Sequenz.

6.4. Hydrazinolyse der Peptid-Polymer-Ester BOC-(Aib-L-Ala)$_n$-OPOE (81,82)

Die Peptid-Polymer-Ester BOC-(Aib-L-Ala)$_3$-OPOE, BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-OPOE, BOC-(Aib-L-Ala)$_4$-OPOE und BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-OPOE werden nach folgender Vorschrift durch Hydrazinolyse vom Polymer abgespalten.
Zu einer Lösung von 50 µmol Peptid-Polymer-Ester in 2 ml Ethanol gibt man 1 ml (20 mmol) Hydrazinhydrat und kocht 2 h am Rückfluß. Nach 15-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird am Hochvakuum abgedampft und anschließend das Polyoxyethylen aus warmem Ethanol durch Kristallisation abgetrennt. Die Peptidhydrazide werden mit Ether als gallertartiger Niederschlag ausgefällt. Verunreinigungen werden durch Säulenchromatographie über Kieselgel-60 (vgl. 6.1.) mit Chloroform/Methanol (4:1) als Elutionsmittel und über Sephadex G 15 mit Wasser/Ethanol (85:15) abgetrennt. Für die einzelnen Hydrazide werden folgende Analysenergebnisse erhalten.

BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_4$-NH-NH$_2$	Ber.	Ala 1,00 Aib 0,80
	Gef.	Ala 1,00 Aib 0,76
BOC-(Aib-L-Ala)$_4$-NH-NH$_2$	Ber.	Ala 1,00 Aib 1,00
	Gef.	Ala 1,00 Aib 1,00
BOC-L-Ala-(Aib-Ala)$_3$-NH-NH$_2$	Ber.	Ala 1,00 Aib 0,75
	Gef.	Ala 1,00 Aib 0,72

BOC-(Aib-L-Ala)$_3$-NH-NH$_2$ wird durch Edman-Abbau an fester Phase analysiert und ergibt die erwartete Sequenz.

6.5. Spektroskopie

6.5.1. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden an einem JASCO-J-20A Spektrographen bei 25°C aufgenommen. Die Temperaturabhängigkeit der CD-Spektren zwischen 8° und 60°C (± 0,5°C) wurde an einem Roussel-Jouan-Dichrograph CD-185 mit FK-2 Thermostat (Haake, Karlsruhe) gemessen. Dabei wurde die Temperatur vor jeder

Messung mindestens 15 min konstant gehalten. Jedes Spektrum wurde zweimal unabhängig gemessen (θ_M-Werte unkorrigiert). Eine Standardlösung von Epiandosteron in Dioxan mit einer molaren Elliptizität von $[\theta]_{304} = 10.925$ grd cm^2/dmol wurde zur Eichung beider Geräte verwendet. Bei 220 nm wurde mit D (-)-2-Hydroxy-3,3-dimethyl-butyrolacton eingestellt.

Die Konzentration der Peptid-Polymer-Ester wurde über die Analysenwerte der Beladungskontrollen ermittelt. Die Messungen wurden, wenn nicht anders vermerkt, in Lösungen von 5 x 10^{-4} mol/l in Ethanol (95 %) uvasol durchgeführt. Bei der Lösungsmittelabhängigkeit wurde 1,1,1-Trifluorethanol (p.a., Merck) und Wasser (bidestilliert) verwendet.

6.5.2. FT-FIR-Spektroskopie

Zur Aufnahme der FIR-Spektren der Peptid-Polymer-Ester wurden jeweils 20 mg Substanz eingewogen und unter gleichem Druck zu Tabletten gepreßt. Diese wurden am FIR 30 von Polytec spektroskopiert.

6.5.3. PFT-^{13}C-NMR-Spektroskopie

Die ^{13}C-NMR-Spektren wurden an einem HFX-90-Multikern-NMR-Spektrometer (22,63 MHz für ^{13}C) bzw. einem WP 60 (15,08 MHz für ^{13}C) der Firma Bruker mit Breitbandentkopplung aufgenommen.
Die Impulsinterferogramme wurden in einem BNC-12 und BNC-28-Computer gespeichert und Fourier transformiert. Die Pulsbreite betrug 2-3 µsec, die Temperatur 303°K. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf internes Tetramethylsilan. Als Lösungsmittel wurden CD_3OD und $^{12}CD_3OD$ verwendet.

6.6. Hämolyse (19)

6.6.1. Einstellung der Erythrozytensuspension

Zu 18 ml 3,8 prozentiger Natriumcitratlösung wurden 2 ml frisches Venenblut gegeben. Bei 1000 Upm wurde 2 min zentrifugiert um das Plasma abzutrennen. Zweimal wurde mit 20 ml des folgenden Puffers gewaschen:
Puffer: 10 mmol/l Phosphat (aus NaH_2PO_4 und Na_2HPO_4)
154 mmol/l Natriumchlorid, (auf pH 7,0 eingestellt)
Zuletzt wird der Rückstand in 18 ml Puffer aufgenommen. 0,2 ml dieser Erythrozytensuspension (nur vorsichtig schütteln!) werden zu 2,7 ml Puffer gegeben und mit 0,1 ml Methanol versetzt. Es werden einige Körnchen Digitonin zugesetzt, was nach einigen Minuten zur vollständigen Lyse führt. Zu 2 ml dieser klaren Lösung werden zuerst 0,1 ml einer 1 prozentigen $K_3Fe(CN)_6$-Lösung, und dann nach 5 min 0,2 ml einer 0,1 prozentigen KCN-Lösung gegeben. Bei 546 nm wird die Extinktion dieser Lösung gemessen (Zeiss-Photometer M 4 Q III). Als Blindwert dient eine von Anfang an gleichbehandelte Probe ohne Digitonin. Ist die Extinktion größer als 0,5, so muß die Erythrozytensuspension solange mit Puffer verdünnt werden, bis diese nach der oben angegebenen Prozedur eine Extinktion von 0,5 ergibt. Für jede Messung muß auch der Blindwert stets von Neuem angesetzt werden. Die Suspension wurde maximal 1 Tag bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt.

6.6.2. Aufnahme der Dosis-Wirkungskurven der Hämolyse

Zunächst werden 0,2 ml einer methanolischen Peptidstammlösung hergestellt, die die doppelte Konzentration gegenüber der Hämolyseanfangskonzentration aufweist. Der Gehalt wird durch Aminosäureanalyse exakt bestimmt und beträgt $6,6 \times 10^{-5}$ mol/l. 0,1 ml dieser Stammlösung gibt man zu 2,7 ml Phosphatpuffer; man erhält eine klare Lösung. Die restliche Stammlösung wird zum Herstellen einer

Verdünnungsreihe verwendet und analog weiter bearbeitet. Die Peptid-Puffer-Lösungen und die Erythrozytensuspension werden auf die Inkubationstemperatur von 37°C gebracht und je 2,8 ml Peptid-Puffer-Lösung der Verdünnungsreihe mit je 0,2 ml Erythrozytensuspension versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Arbeitet man in umgekehrter Folge und fügt zuerst die Erythrozytensuspension zum Phosphatpuffer und danach die Peptidstammlösung, ergeben sich bei gleicher Inkubationszeit und-temperatur dieselben Ergebnisse. Nach der Inkubation wird 1 min bei 1000 Upm zentrifugiert und je 2 ml des Überstandes werden wie oben mit $K_3Fe(CN)_6$ und KCN weiterbehandelt. Die Extinktion wird wieder gegen einen Blindwert aus 2,7 ml Phosphatpuffer, 0,1 ml Methanol und 0,2 ml Erythrozytensuspension gemessen, die wie die Proben weiter behandelt worden ist.

6.7. Leitfähigkeitsmessungen an künstlichen Lipid-Doppelschichtmembranen

Die Versuche werden in einer aus zwei gleichgroßen Kammern bestehenden Teflonzelle durchgeführt. Die Trennwand der Kammern besitzt in der Mitte ein Loch von 0,1 mm Durchmesser. Über das Loch wurde eine Lipidlösung bestehend aus 2 % Asolectin und 0,4 % Cholesterin in Dekan oder Hexadekan gestrichen. Der Tropfen verdünnt sich zu einer bimolekularen Membran, deren Dicke bei der Wahl von Dekan als Lösunsmittel d = 47 Å und bei der Wahl von Hexadekan d = 30 Å beträgt. Asolectin ist ein aus Sojabohnen extra hiertes Lipidgemisch, mit dem sich stabile, rauscharme Membranen herstellen lassen. Spannung und Strom werden über zwei Ag/AgCl Elektroden angelegt bzw. gemessen (138). Dekan- und Hexadekan-Membranen zeigen einen qualitativ gleichen Effekt der Membranmodifizierung durch das Nonadekapeptid. Die speziellen Versuchsbedingungen des aufgeführten Beispiels sind in der Abbildung (4.2) angegeben.

7. Zusammenfassung

Als synthetische Analoga des Peptidantibiotikums Alamethicin wurden das Nonadekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Gly-Ala-Aib-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (Ia), dessen Derivat mit freier Glutaminsäure-Carboxylgruppe in Position 18 (Ib) und das Hexadekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_5$-Pro-Ala-Aib-Aib-Glu(OBzl)-Gln-OMe (II) durch Fragmentkondensation darstellt.

Zu Konformationsuntersuchungen wurden Modellpeptide des lipophilen, N-terminalen Teils der synthetisierten Peptide (Ia,b und II) mit alternierender Aib-L-Ala-Sequenz am solubilisierenden polymeren Träger Polyoxyethylen bis zum Tetradekapeptid BOC-(Aib-L-Ala)$_7$-OPOE synthetisiert.

Konformationsanalysen der CD-Spektren nach drei verschiedenen Methoden ergaben eine starke Tendenz der polymerveresterten Peptide, mit wachsender Kettenlänge eine α-helikale Konformation auszubilden. Diese betrug beim Tetradekapeptid 40 % der Gesamtkonformation. Die synthetisierten Peptidanaloga wiesen ebenfalls einen signifikanten α-Helix-Anteil auf, der beim Nonadekapeptid (Ia) mit 44 % höher liegt als bei Alamethicin F-50 mit 35 % und dem Hexadekapeptid (II) mit 24 %.

Die ^{13}C-NMR-Spektren dienten neben der Identifizierung der Peptide auch zu Konformationsstudien, welche die Ergebnisse der CD-Untersuchungen bestätigten. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. D. Leibfritz, Bremen, wurde für die polymerveresterten Peptide mit der ^{13}C $\{^{13}C-^{1}H\}$ Tripelresonanz-PFT-NMR-Spektroskopie eine neue konformationsanalytische Methode eingeführt.

Die ebenfalls erstmals auf polymerveresterte Peptide angewandte FT-FIR-Spektroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. V. Hoffmann, Tübingen, durchgeführt. Dabei konnten die beiden Absorptionsbanden bei 330 cm^{-1} und 370 cm^{-1} α-helikalen Konformationsanteilen in den Peptiden zugeordnet werden.

Die synthetisierten Analoga von Alamethicin wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Fähigkeit zur Hämolyse von Humanerythrozyten untersucht. Das Nonadekapeptid (Ia) wies dabei eine Lyseaktivität auf, die derjenigen der natürlichen Peptidantibiotika Alamethicin und Trichotoxin gleicht; das Hexadekapeptid (II) war dagegen im untersuchten Konzentrationsbereich bis 10^{-4} mol/l inaktiv.

Die in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. G. Boheim, Bochum, durchgeführten Messungen an künstlichen Lipid-Doppelschichten führten zu einem Leitfähigkeitsanstieg bei Zugabe von Nonadekapeptid (Ia) bzw. (Ib) unter Ausbildung von Bursts. Die Leitfähigkeit des Nonadekapeptids (Ia) mit der γ-Benzylestergruppe an Glutaminsäure-18 war dabei 5-10 mal so groß wie die des Nonadekapeptids (Ib) mit freier γ-Carboxylgruppe. Das Hexadekapeptid (II) zeigte auch bei diesen Untersuchungen keine Aktivität. Besonderes Interesse erregte die Beobachtung, daß das Nonadekapeptid die Einzelporen von Alamthicin stabilisiert und somit ihre Lebensdauer erhöht.

8. Literaturverzeichnis

1) Pressman, B.C., Harris, E.J., Jagger, W.S. und Johnson, J.H. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 58,1949

2) Meyer, P. und Reusser, F. (1967) Experentia, 23, 85

3) Ooka, T., Shimojina, Y., Akimoto, T., Takeda, I., Senoh, S., und Abe, J. (1966) Agr. Biol. Chem. 30, 700-702

4) Ooka, T. und Takeda, I. (1972) Agr. Biol. Chem. 36,112

5) Hou, C.T., Ciegler, A. und Hesseltine, C.W. (1972) Applied Microbiology, 23, 183

6) Irmscher, G., Bovermann, G., Boheim, G. und Jung, G. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 507, 470

7) Payne, J.W., Jakes, R. und Hartley, B.S. (1970) Biochem. J. 117, 757

8) Ovchinnikov, Y.A.,Kiryushkin, A.A. und Kozhevnikova, J.V. (1971) Zhurnal Obshchei Knimii 41, 2085

9) Jung, G., Dubischar, N., Leibfritz, D., Ottnad, M., Probst, H. und Stumpf, C. (1974) Peptides, Proc. 13 th Eur. Pept. Symp., Jerusalem, 345

10) Jung, G., Dubischar, N. und Leibfritz, D. (1975) Eur. J. Biochem. 54, 395

11) Martin, D.R. und Williams, R.J,P. (1975) Biochem. Soc. Trans., Proc. 533 rd Meeting, Vol.3, 166

12) Pandey, C.R., Cook, J.C., Kenneth, L. und Rinehart, K.L. (1977) J. Amer. Chem. Soc. 99, 8469

13) Irmscher, G. und Jung, G. (1977) Eur. J. Biochem. 80,165

14) Shamala, N., Nagaraj, R. und Balaram, P. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 79, 292

15) McMullen, A.I. (1970) Biochem. J. 119, 10

16) McMullen, A.I., Marlborough, D.J. und Bayley, P.M. (1971) FEBS Lett. 16, 278

17) Burgess, A.W. und Leach, S.J. (1973) Biopolymers, 12, 2691

18) Mayr, W., Oekonomopulos, R. und Jung, G. (1978) Biopolymers, in press

19) Irmscher, G. (1977) Dissertation, Universität Tübingen

20) Dubischar, N., Diehn, B. und Jung, G. (1973) Abstr. 24 th Int. Congr. Pure Appl. Chem., Hamburg, 178

21) Jung, G., Leibfritz, D., Ottnad, M., Dubischar, N. und Probst, H. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1213

22) Jung, G., Dubischar, N., Irmscher, G., Mayr, W. und Oekonomopulos, R. (1977) Chemiker Ztg. 101, 196

23) Pressman, B.C. (1968) Fed. Proc. 27, 1283

24) Mueller, P. und Rudin, D.O. (1968) Nature, 217, 713

25) Mueller, P. (1975) Ann. N.Y. Acad. Sci. 264, 247

26) Gordon, L.G.M. und Haydon, D.A. (1972) Biochim. Biophys. Acta 255, 10

27) Gordon, L.G.M. und Haydon, D.A. (1975) Phil. Trans. Roy. Soc. London B270, 433

28) Boheim, G. (1974) J. Membrane Biol. 19, 277

29) Boheim, G., Janko, K., Leibfritz, D., Ooka, T., König, W.A. und Jung, G. (1976) Biochim Biophys. Acta, 433, 182

30) Boheim, G., Irmscher, G. und Jung, G. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 507, 485

31) Boheim, G. und Kolb, H.A. (1978) J.Membrane Biol. 38, 99

32) Yantorno, R.E., Takashima, S. und Mueller, P. (1977) Abstr. 21 th Meeting Biophys. Soc., New Orleans

33) Bayley, P.M. (1973) in Progress and Molecular Biology, 27, S.3 (ed. Butler, J.A.V.; Noble, D.) Pergamon Press, Oxford

34) Katz, E. (1968) Lloydia, 31, 364

35) Perlman, D. und Bodanszky, M. (1971) Ann. Rev. Biochem. 40, 449

36) Kleinkauf, H. und Koischwitz, H. (1978) Progr. Mol. Subcell. Biol. 6, 59

37) Martin, D.R. und Williams, R.J.P. (1976) Biochem. J. 153, 181

38) Oertel, B. (1978) Diplomarbeit, Universität Tübingen

39) Leplawy, M.T., Jones, D.S., Kenner, G.W. und Sheppard, R.C. (1960) Tetrahedron, 11, 39

40) Jones, D.S., Kenner, G.W., Preston, J. und Sheppard, R.C. (1965) J. Chem. Soc. 6227

41) Dubischar, N. (1976) Dissertation, University of Toledo

42) Kendrick, N.C.E. (1973) Dissertation, University of Washington

43) Gisin, B.F., Kobayashi, S. und Hall, J.E. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 74, 115

44) Fasman, G.D. und Chou, P.Y. (1974) in Peptides, Polypeptides and Proteins (ed. Blout, E.R., Bovey, F.A., Goodman, M. und Lotan, N.), Israel, 114

45) Mutter, M. Hagenmaier, H.P. und Bayer, E. (1971) Angew. Chem. 83, 883

46) Bayer, E. und Mutter, M. (1972) Nature, 237, 512

47) Oekonomopulos, R. (1976) Diplomarbeit, Universität Tübingen

48) Merrifield, R.B. (1963) J. Amer. Chem. Chem. Soc. 85 2149

49) Marshall, G.R. und Merrifield, R.B. (1965) Biochem. 4, 2396

50) Bayer, E., Eckstein, H., Hägele, K., König, W.A., Brüning, W., Hagenmaier H. und Parr, W. (1970) J. Amer. Chem. Soc. 92, 1735

51) Bayer, E. und Mutter, M. (1974) Chem. Ber. 107, 1344

52) Mutter, M. (1972) Dissertation, Universität Tübingen

53) Leibfritz, D., Mayr, W., Oekonomopulos, R. und Jung, G. (1978) Tetrahedron 34, 2045

54) Jung, G., Oekonomopulos, R., Mayr, W., Bovermann, G. und Leibfritz, D. (1978) Proceedings of the European Conference on NMR of Macromolecules, Sassary, Italien, in press

55) Mutter, M., Mutter, H., Uhmann, R. und Bayer, E. (1976) Biopolymers 15, 917

56) Malcolm, B.R. (1977) Biopolymers, 16, 2591

57) Woiwode, W., Frank, H., Nicholson, G.J. und Bayer, E. (1978) Int. J. of Peptide und Protein Res., eingereicht zur Veröffentlichung

58) Wieland, T. und Bernhard, H. (1951) Liebigs Ann. Chem. 572, 190

59) Vangham, J.R. (1951) J.Amer. Chem. Soc. 73, 3547

60) Weygand, F., Huber, P. und Weiss, K. (1967) Z.Naturforsch. 22b, 1084

61) Flor, F., Birr, C. und Wieland, T. (1973) Liebigs Ann. Chem. 1601

62) Tilak, M.A. (1971) Tetrahedron Letters 11, 849

63) Sheehan, J.C. und Hess, G.P. (1955) J.Amer. Chem. Soc. 77, 1067

64) Sheehan, J.C., Goodman, M. und Hess, G.P. (1956) J. Amer. Chem. Soc. 78, 1367

65) König, W. und Geiger, R. (1970) Chem. Ber. 103, 788

66) Curtius, T. (1902) Chem. Ber. 35, 3226

67) Honzl, A. und Rudinger, W. (1961) Coll. Czech. Chem. Comm. 26, 2333

68) Klausner, Y.S. und Bodanszky, M. (1974) Synthesis 549

69) Fletcher, G.A. und Young, G.T. (1972) J.Chem. Soc., Perkin I, 1867

70) Fletcher, G.A., Löw, M. und Young, G.T. (1973) J. Chem. Soc., Perkin I, 1162

71) Wachter, E., Machleidt, W., Hofner, H. und Otto, J. (1973) FEBS Lett. 35, 97

72) Laursen, R.A., Bonner, A.G. und Horn, M.J. (1975) Instrumentation in Amino Acid Sequence Analysis (ed. Perkam, N.R.) Ac. Press. New York, S. 73

73) Jung, G., König, W.A., Leibfritz, D., Ooka, T., Janko, K. und Boheim, G. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 433, 164

74) Weber, U. (1976) Z. f. Naturforschung, 316, 1157

75) Drees, F. in Houben Weyl, Methoden der organischen Chemie, XV/1, S. 646, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

76) Albrecht, H. (1977) Dissertation, Universität Tübingen

77) Frank, H., Nicholson, G.J. und Bayer, E. (1977) J. Chromatogr. Sci. 15, 174

78) Burnfeldt, K., Roepstorff, P. und Thomson, J. (1969) Acta Chim. Scand. 23, 2906

79) Dorman, L.C. (1969) Tetrahedron Lett. 28, 2319

80) Schattenberg, M. (1975) Dissertation, Universität Tübingen

81) Erlanger, B.F. und Brand, E. (1951) J.Amer. Chem. Soc. 73, 3508

82) Hofmann, K. et al. in Houben Weyl, Methoden der organischen Chenie XV/2. S. 298, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974

83) Schellmann, J.A. und Oriel, P. (1962) J. Chem. Phys. 37, 2114

84) Woody, R.W. und Tinoco, I. (1967) J.Chem. Phys. 46, 4927

85) Tinoco, I. und Cantor, C.R. (1970) Meth. Biochem. Anal. 18, 81

86) Pysh, E.S. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 56, 825

87) Rosenkranz, H. und Scholtan, W. (1971) Hoppe-Seylers Z. f. Physiol. Chem. 352, 896

88) Rosenkranz, H. (1974) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12 415

89) Woody, R.W. (1974) in "Peptides, Polypeptides and Proteins", 338

90) Bragg, L., Kendrew, J.C. und Perutz, M.F. (1950) Proc. Roy. Soc. (London) A203, 321

91) Woody, R.W. und Tinoco, I. (1967) J. Chem, Phys. 46, 4927

92) Greenfield, N. und Fasman, G.D. (1969) Biochem. 8, 4108

93) Schmidt, G.M.J., Hodgkin, D.C. und Oughton, B.M. (1957) Biochem. J. 65, 744

94) Schwyzer, R., Sieber, P. und Gorup, B. (1958) Chimia, 12, 53

95) Kawai, M. und Fasman, G. (1978) J. Amer. Chem. Soc. 100, 3630

96) Venkatachalam, C.M. (1968) Biopolymers, 6, 1425

97) Burgess, A.W. und Leach, S.J. (1973) Biopolymers 12, 2599

98) Toniolo, C. und Bonora, G.M. (1975) Makromol. Chem. 176, 2547

99) Bonora, G.M., Toniolo, C. und Mutter, M. (1978) Biopolymers, in press

100) Mutter, M. (1977) Macromolecules, 10, 1413

101) Saxena, V.P. und Wetlaufer, D.B. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 969

102) Chen, Y.H., Yang, J.T. und Martinez, H.M. (1972), Biochem. 11, 4120

103) Chen, Y.H., Yang, J.T. und Chan, K.H. (1974) Biochem. 13, 3350

104) Magar, E. (1968) Biochem. 7, 617

105) Magar, E. (1972) Data Analysis in Biochem. and Biophys., New York Ac. Press, 104

106) Townend, R., Kumosinski, T.F., Timasheff, S.N., Fasman, G.D. und Davidson, B. (1966). Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 163

107) Sarkar, P. und Doty, P. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 981

108) Li, L.K. und Spector, A. (1966) J. Amer. Chem. Soc. 91, 220

109) Myer, Y.P. (1970) Res. Commun. Chem. Phatol. Pharmacol. 1, 607

110) Tiffany, M.L. und Krimm, S. (1969) Biopolymers, 8, 347

111) Ronish, E.W. und Krimm, S. (1972) Biopolymers, 11, 1919

112) Tiffany, M.L. und Krimm, S. (1972) Biopolymers, 11, 2309

113) Tiffany, M.L. und Krimm, S. (1973) Biopolymers, 12, 575

114) Quadrifoglio, F. und Urry, D.W. (1968) J. Amer. Chem. Soc. 90, 2760

115) Chen, Y.H. und Yang, J.T. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1285

116) Grosse, R., Malur, J. und Repke, K.R.H. (1971) Acta Biol. Med. Ger. 27, K25

117) Grosse, R., Malur, J. und Repke, K.R.H. (1972) FEBS Lett. 25, 313

118) Schälike, W., Becker, M. und Zwirner, D. (1973) Studia Biophysica, Berlin, 35, 221

119) Bannister, W.H. und Bannister, J.V. (1974) Z. f. Naturforschung C, 29, 9

120) Bannister, W.H. und Bannister, J.V. (1974) Int. J. Biochem. 5, 679

121) Tinoco, I. und Woody, R.W. (1963) J. Chem. Phys. 38, 1317

122) Vournakis, J.N., Yan, J.F. und Schraga, H.A. (1968) Biopolymers, 6, 1531

123) Ingwall, R.T., Gilon, C. und Goodman, M. (1975) J. Am. Soc. 97, 4356

124) Goodman, M., Ingwall, R.T. und St. Pierre, S. (1976) Macromolecules, 9, 1

125) Palumbo, M. Da Rin, S., Bonora, G.M. und Toniolo,C. (1976) Makromol. Chem. 177, 1477

126) Bonora, G.M., Palumbo, M., Toniolo,C. und Mutter, M. (1978) Makromol. Chem. in press

127) Miyazawa, T. (1961) Bull. Chem. Soc. Japan, 34, 691

128) Shotts, W.J. und Sievers, A.J. (1973) Chem. Phys. Lett. 21, 586

129) Miyazawa, T. (1967) Poly-α-Amino Acids, ed. Fasman, G.D., Dekker, New York

130) Lyerla, J.R., Brian, H.B. und Murray, H.F. (1973) Can, J. Biochem. 51, 460

131) Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C., Paolillo, L., Tancredi, T., Temussi, P.A. und Trivellone, E. (1974) Peptides, Polypeptides and Proteins (ed. Blout, E.R., Bovey, F.A., Goodman, M. und Lotan, N.) John Wiley und sons, New York, S. 190

132) Tomlinson, B.L. und Hill, H.D.W. (1973) J. Chem. Phys. 59, 1775

133) Branik, M. und Kessler, H. (1975) Chem. Ber. 108, 2176

134) Grathwohl, C. und Wüthrich, K. (1976) Biopolymers, 15 2025

135) Grathwohl, C. und Wüthrich, K. (1976) Biopolymers, 15 2043

136) Pietrzik, E. (1977) Dissertation, Universität Tübingen

137) Dawson, C.R., Drake, A.F., Helliwell, J. und Hider, R.C. (1978) Biochim Biophys. Acta, 510, 75

138) Boheim, G.,unveröffentlichte Ergebnisse

139) Boheim, G. und Kolb, H.A. (1978) J.Membrane Biol. 38, 151

140) Riddick, J.A. und Bunger, W.B. (1970) Organic Solvents, Physical Propertis and Methods of Purification, New York

141) von Arx, E., Fanpel, M. und Brugger, M, (1976) J. Chromatogr. 120, 224

142) Stahl, E. (ed.) Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl. Berlin, Heidelberg & New York 1967 (S. 146)

143) Carpino, L.A. (1957) J. Amer. Chem. Soc. 79, 4427

144) Nietzki, R. und Braunschweig, E. (1894) Ber. dt. Chem. Ges. 27, 3381

145) Guttman, S. und Boissonas, R.A. (1958) Helv. Chim. Acta, 48, 1852

146) Hayakawa, T., Horada, K. und Fox, S.W. (1966) Bull. Chem. Soc. Jap. 39, 391

147) Schnabel, E. (1967) Liebigs Ann. Chem. 702, 188

148) Anderson, G.W. und McGregor, A.C. (1957) J. Amer. Chem. Soc. 79, 6180

149) Sandrin, E. und Boissonas, R.A. (1963) Helv. Chim. Acta, 45, 1637

150) Polzhofer, K.P.(1969) Tetrahedron Lett. 27, 2305

151) Greenstein, J.P. und Winitz, M. (1961) Chemistry of the Amino Acids, Bd. II, S. 296, John Wiley and Sons New York

152) Kliegler, E. und Gibian, H. (1963) Liebigs Ann. Chem. 633, 188

153) Brenner, M., Müller, H.R. und Pfitzer, W. (1950) 33 568

154) Goldschmidt, S. und Gupta, K.K. (1965) Chem. Ber. 98, 2831

155) Poddubnaya, N.A., Balandina, G.N. und Tambieva, O.A. (1971) J. Gen. USSR, 41I, 428

156) Rabol, J.R., Moore, W.H. und Krimm, S. (1977) Macromolecules, 10, 1065

157) Barton, G.M., Evans, R.S. und Garcher, J.A.F. (1952) Nature, 170, 249

Lebenslauf

Name	Oekonomopulos, Raymond
Geburtsdatum, -ort	10.04.1948, Schorndorf/Württ.
Eltern	Oekonomopulos, Anastasios Oekonomopulos, Anneliese (geb. Schmid)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Ausbildung	
1954-1958	Grundschule Schorndorf
1958-1964	Gymnasium Schorndorf
1964-1970	Studium an der Naturwissenschaftlich-Technischen Akademie Prof. Dr. H. Grübler in Isny, dazwischen von 1966-1968 Praktikum bei AEG-Telefunken in Backnang
22.5.1970	Ingenieur-Examen
1970-1972	Tätigkeit bei AEG-Telefunken, Backnang, als Ingenieur, von Juli 1970 bis Dezember 1971 durch Ableistung des Wehrdienstes unterbrochen
24.3.1972	Eheschließung mit Irene Schladetsch aus Kiel
1972-1976	Chemie-Studium an der Universität Tübingen mit Diplom-Examen am 1.3.1976. Experimentelle Diplomarbeit von September 1975 bis Februar 1976 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. G. Jung
SS 1976-SS1978	Durchführung der experimentellen Doktorarbeit "Synthese und Konformation membranmodifizierender Analoga des Nonadekapeptid-Antibiotikums Alamethicin" unter der Leitung von Prof. Dr. G. Jung am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen
5.3.1978	Geburt unserer Tochter Silke

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren
E. Bayer, M. Hanack, H. Hagenmaier, G. Jung, S. Kemmler-Sack, W. Kraus, E. Lindner, H. Mauser, E. Müller, D. Oelkrug, W. Rüdorff, W. Rundel, F.F. Seelig, H. Suhr, W.Voelter, W. Zeil.